



**Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid**

**IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO RECEPTOR NICOTÍNICO
MIXTO $\alpha 7 \text{dup} \alpha 7$ Y SU PAPEL FISIOPATOLÓGICO EN LA
NEUROTRANSMISIÓN Y NEUROINFLAMACIÓN**

TESIS DOCTORAL

Carolina Martín Sánchez

Madrid, 2017



**Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid**

Dra. CARMEN MONTIEL LÓPEZ, Catedrática del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina, y Dr. FRANCISCO ARNALICH FERNÁNDEZ, Catedrático de Medicina Interna del Departamento de Medicina, de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN, que Carolina Martín Sánchez ha realizado, bajo su dirección, el presente trabajo titulado: **“Identificación de un nuevo receptor nicotínico mixto $\alpha 7$ dup $\alpha 7$ y su papel fisiopatológico en la neurotransmisión y neuroinflamación”**, como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid 27 de Junio 2017.

Fdo. Profa. Carmen Montiel López

Fdo. Prof. Francisco Arnalich Fernández

Índice

ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	15
1. RECEPTOR NICOTÍNICO	17
2. BIOGÉNESIS DE LOS nAChRs	22
3. SUBTIPOS DE nAChRs NEURONALES: DISTRIBUCIÓN Y FARMACOLOGÍA.....	25
4. LOCALIZACIÓN DE LOS nAChRs NEURONALES.....	34
5. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR LA ELEVACIÓN DEL $[Ca^{2+}]$ INDUCIDA POR nAChR	37
6. EXOCITOSIS: ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-SECRECIÓN	39
7. EL RECEPTOR NICOTÍNICO DEL SUBTIPO $\alpha 7$	40
8. LA SUBUNIDAD NICOTÍNICA dup $\alpha 7$: UNA NUEVA SUBUNIDAD DEL nAChR	45
9. EL $\alpha 7$ -nAChR DE MACRÓFAGOS Y SU PAPEL FUNCIONAL EN EL CONTROL DE LA INFLAMACIÓN: VIA COLINÉRGICA ANTIINFLAMATORIA	50
11. DEPRESIÓN MAYOR	57
OBJETIVOS	77
MATERIALES Y MÉTODOS	81
1. SOLUCIONES, REACTIVOS, KITS COMERCIALES Y ANTICUERPOS EMPLEADOS.....	83
2. CULTIVOS CELULARES.....	86
3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN DEL PLÁSMIDO.....	88
4. PROCEDIMIENTOS DE TRANSFECCIÓN	88
5. ANÁLISIS DE COLOCALIZACIÓN DE SUBUNIDADES.....	91
NICOTÍNICAS CON LA MEMBRANA CITOSÓLICA POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	91
6. TÉCNICA DE TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE RESONANCIA DE FÖSTER ENTRE FLUOROCROMOS (FRET).91	
7. TÉCNICA DE CITOMETRÍA PARA ANALIZAR EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE $\alpha 7$ -nAChRs FUNCIONALES EN LA MEMBRANA CELULAR.	93
8. PREPARACIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON EXPRESIÓN ESTABLE DE dup $\alpha 7$ -myc.....	94
9. TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-qPCR).....	96
10. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA CELULAR POR INMUNOBLOT	98
11. SEÑALES E Ca^{2+} INTRACELULARES POR SONDAS FLUORESCENTES	99

12. SECRECIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN CÉLULA ÚNICA CON LA Sonda FM1-43.	101
13. SECRECIÓN DE DOPAMINA EN POBLACIONES CELULARES POR LA TÉCNICA DE ELISA.	103
16. SELECCIÓN DE PACIENTES CON DEPRESIÓN MAYOR Y EXTRACCIÓN DE SANGRE.	107
17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	108
RESULTADOS.....	109
1. LA SUBUNIDAD dup α 7 INTERACCIONA FÍSICAMENTE CON EL α 7-nAChR EN VARIAS LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFEROS.	111
1.1 La transfección de dup α 7 en células GH4C1 reduce el número de α 7-nAChRs expresados en la membrana celular.	111
1.2 Interacción física de subunidades α 7 y dup α 7 en células GH4C1.	114
1.3 Interacción física de subunidades α 7 y dup α 7 en células RAW 264.7.....	115
1.4 Interacción física de subunidades α 7 y dup α 7 en células SH-SY5Y.	117
1.5 La subunidad dup α 7 forma receptores mixtos con la subunidad α 7 (α 7dup α 7-nAChR) en células RAW 264.7 en detrimento de la expresión en membrana de α 7-nAChR homoméricos funcionales.....	119
2. REPERCUSIÓN FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN α 7/dup α 7 A NIVEL DE LA NEUROTRANSMISIÓN.	121
2.1 Preparación y selección de células SH-SY5Y con sobreexpresión estable de dup α 7-myc.	121
2.2 Efecto de la sobreexpresión de dup α 7 sobre la señal de $[Ca^{2+}]_i$ mediada por el α 7-nAChR en poblaciones de células SH-SY5Y.	125
2.3 Efecto de la sobreexpresión de dup α 7 sobre la señal de $[Ca^{2+}]_i$ mediada por el α 7-nAChR en célula SH-SY5Y única.....	130
2.4 Efecto de la sobreexpresión de dup α 7 sobre la exocitosis inducida por PNU 282987 en célula SH-SY5Y única.	135
2.5 Efectos de la sobreexpresión de dup α 7 y del silenciamiento génico de dup α 7 endógeno sobre la liberación de dopamina en poblaciones de células SH-SY5Y.	138
3. LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE α 7 ARNm CORRELACIONAN DE FORMA NEGATIVA CON LA GRAVEDAD CLÍNICA DEL PACIENTE DEPRESIVO.	141
4. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE α 7 Y dup α 7 POR MEDIADORES INFLAMATORIOS.	146
5. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS DISTINTAS SUBUNIDADES NICOTÍNICAS POR FÁRMACOS ANTIDEPRESIVOS.	148
DISCUSIÓN	153
1. Identificación de un nuevo receptor nicotínico heteromérico: α 7dup α 7-nAChR.	156
2. Obtención de clones de células SHS-Y5Y con sobreexpresión de dup α 7.	158

3. El nuevo $\alpha 7$ dup $\alpha 7$ -nAChR tiene consecuencias funcionales a nivel de la neurotransmisión.	160
4. Expresión del $\alpha 7$ ARNm como marcador del curso evolutivo de la depresión.	163
5. Un estímulo inflamatorio agudo modifica la expresión de $\alpha 7$ ARNm en neuronas y microglía lo que podría contribuir a un estado depresivo.	164
6. Los fármacos antidepresivos modifican la expresión de ARNm de ciertas subunidades nicotínicas en células neuronales y microglía.	165
CONCLUSIONES	169
ANEXOS	173
BIBLIOGRAFÍA	183

Abreviaturas

aa	aminoácidos
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ACTH	corticotropina
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Akt	Serina/treonina proteína quinasa B
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico total
ATC	Antidepresivo tricíclico
ATV	Área tegmental ventral
α-BGTX	Alfa-bungarotoxina (antagonista selectivo de $\alpha 7$ -nAChR)
BDNF	Factor neurotrófico del cerebro (del inglés "Brain-Derived Neurotrophic Factor")
BHE	Barrera HematoEncefálica
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración de Calcio intracelular
CamKII	Ca ²⁺ /calmodulina proteína quinasa II
CAP	Vía colinérgica antiinflamatoria (del inglés, "Cholinergic Antiinflammatory Pathway")
CCDV	Canal de Calcio Dependiente de Voltaje
CREB	Factor de transcripción nuclear que se une a secuencias de ADN denominadas "elementos de respuesta a AMPc"
CRF	Hormona liberadora de corticotropina
DAPI	4'6-diamino-2-fenilindol (marcador nuclear)
DA	Dopamina
EC₅₀	Concentración de fármaco necesaria para originar la mitad de la respuesta máxima
E.E.M.	Error estándar de la media
ELISA	Inmunoensayo (del inglés "Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay")
ERK/MAPK	Subfamilia de la MAPK regulada por señales extracelulares
FRET	Transferencia de energía entre fluorocromos
FST	Prueba de natación forzada, test animal para el estudio de la depresión (del inglés "Forced Swim Test")
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés, Green Fluorescence Protein)
HPA	Eje Hipotalámico- pituitario-adrenal
HRP	Peroxidasa de rábano picante
5-HT	Serotonina
HS	Suero de Caballo (del inglés "horse serum")
IDO	indoleamina 2,3 dioxigenasa

IFN	Interferón (molécula inflamatoria)
IL	Interleuquina
IMAO	Inhibidor de la monoamino oxidasa
IP₃R	Receptor Inositol trifosfato
ISRN	Inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina
ISRS	Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
JAK2	Tirosina quinasa Janus II
KA	Ácido quinurénico
KH	Solución osmótica Krebs Hepes
KYN	Kinureina
LPS	Lipopolisacárido
MAP	Modulador Alostérico Positivo
MTT	Ensayo de viabilidad y proliferación celular
NA	Noradrenalina
nAChR	Receptor nicotínico para la acetilcolina
NFκB	Factor de transcripción nuclear kappa B
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PFA	Paraformaldehído
PKA	Proteína Kinasa A
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa (cuantitativa)
QUIN	Ácido quinolínico
RE	Retículo endoplásmico
RT	Retrotranscripción
SFB	Suero Fetal Bovino
siRNA	ARN pequeño de interferencia (del inglés “small interfering RNA”)
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés “single nucleotide polymorphism”)
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TEC	Terapia ElectroConvulsiva
TH	Tirosina hidroxilasa
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
WGA	Lectina con capacidad de unión a las glicoproteínas de la membrana

Resumen

El receptor nicotínico para la acetilcolina del subtipo $\alpha 7$ ($\alpha 7$ -nAChR) está ampliamente distribuido en células del sistema nervioso central (SNC), tanto neuronas como células gliales. Mientras que el receptor expresado por las neuronas modula la liberación de ciertos neurotransmisores (glutamato, dopamina y serotonina), el expresado por la microglía controla el exceso de inflamación cerebral en respuesta a un estímulo lesivo. En el genoma humano se ha identificado un nuevo gen híbrido (*CHRFAM7A*) resultante de la combinación del gen *CHRNA7*, que codifica para la subunidad nicotínica $\alpha 7$, y del gen *FAM*. Durante mucho tiempo fue desconocida la función de la subunidad nicotínica codificada por el gen híbrido, $\text{dup}\alpha 7$. En 2011, nuestro grupo demostró, por primera vez, que el $\text{dup}\alpha 7$ se comportaba como un dominante negativo de la actividad del $\alpha 7$ -nAChR en un modelo de expresión heteróloga, los ovocitos de *Xenopus*. Este hallazgo fue corroborado en estudios posteriores realizados por otros grupos. Hasta la fecha, se desconoce cuál puede ser el papel fisiopatológico de $\text{dup}\alpha 7$ en células de mamíferos, así como el mecanismo por el que se produce la interacción $\alpha 7/\text{dup}\alpha 7$ o las consecuencias fisiopatológicas de dicha interacción. Polimorfismos del gen *CHRFAM7A* han sido asociados a ciertas enfermedades neuropsiquiátricas, como la depresión, la esquizofrenia, el Alzheimer o la demencia por cuerpos de Lewy. En la etiopatogenia de la depresión han sido propuestas varias teorías, una de las cuales propugna la existencia de una inflamación basal en el paciente con elevación de los niveles de citoquinas proinflamatorias.

En base a todo lo anterior, el objetivo central de este trabajo ha sido evaluar si $\text{dup}\alpha 7$ interacciona físicamente con la subunidad $\alpha 7$ formando un receptor pentamérico mixto, en líneas celulares de mamíferos de tipo neuroendocrino (GH4C1), inmune (RAW 264.7) y neuronal (SH-SY5Y), así como dilucidar el papel fisiopatológico de dicha interacción en la neurotransmisión.

Para el estudio funcional, se procedió a la obtención de clones con sobreexpresión estable de $\text{dup}\alpha 7$ de células SH-SY5Y. Los principales hallazgos del presente trabajo demuestran que células de mamíferos, de diversa naturaleza, son capaces de formar un receptor nicotínico mixto con la subunidad $\alpha 7$ ($\alpha 7\text{dup}\alpha 7$ -nAChR) en detrimento de la formación de $\alpha 7$ -nAChR homoméricos. La consecuencia fisiológica de la incorporación de $\text{dup}\alpha 7$ a la estructura pentamérica del nAChR es la reducción de la señal de $[\text{Ca}^{2+}]$, y la neurosecreción mediada por el $\alpha 7$ -nAChR. Dado el papel modulador de $\alpha 7$ -nAChR en la liberación de neurotransmisores y su actividad antiinflamatoria, nos propusimos averiguar si los niveles de expresión de $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ ARNm de células de sangre periférica de pacientes depresivos correlacionaban con la gravedad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento farmacológico. Los resultados arrojaron una perfecta correlación inversa entre ambos marcadores, indicando que la expresión de $\alpha 7$ ARNm puede ser un buen marcador del curso evolutivo de la depresión. Más aún, nos preguntamos si fármacos antidepresivos con diferentes mecanismos de acción, podrían ejercer su efecto terapéutico a través de la regulación de la expresión de las diferentes subunidades nicotínicas, modulando de este modo, la neurosecreción y la neuroinflamación. Nuestros resultados revelan que determinados fármacos aumentan la expresión $\alpha 7$ ARNm en neuronas y/o microglía conduciendo a una mayor liberación de neurotransmisores y una disminución de la neuroinflamación, lo cual puede contribuir a la acción antidepresiva de dichos fármacos.

Introducción

El neurotransmisor acetilcolina (ACh), liberado por las neuronas colinérgicas, ejerce su acción en tejidos neuronales y no neuronales a través de la activación de dos tipos de receptores, los muscarínicos (mAChRs) y los nicotínicos (nAChRs). Ambos tipos de receptores pertenecen a familias estructural y funcionalmente diferentes. Mientras que el primero es un receptor de tipo metabotrópico acoplado a proteínas G y vías de señalización intracelular, el segundo es un receptor ionotrópico ligado a un canal iónico. Estas características hacen que las respuestas inducidas por uno u otro tipo de receptor sean más o menos rápidas: de segundos a minutos para el receptor metabotrópico, y milisegundos para el ionotrópico (Mulle y col. 1992; Unwin 1993).

En el estudio de los nAChRs cabe resaltar tres hallazgos relevantes. Por un lado, la identificación de una alta densidad de nAChRs en el órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata*. Este órgano hizo posible el aislamiento y purificación del primer subtipo de nAChR, el receptor muscular (Briley y Changeux 1977; Sobel y col. 1977). El segundo descubrimiento fue la identificación de ciertas neurotoxinas del veneno de serpientes como la cobrotoxina y la α -bungarotoxina (α -Bgtx) que se unían al nAChR y lo bloqueaban de forma irreversible (Barnard y col. 1977; Fertuck y Salpeter 1974). Finalmente, también fue clave la identificación y cristalización de una proteína de unión a la ACh (AChBPs) presente en el caracol *Lymnaea stagnalis* y en los crustáceos *Aplysia californica* y *Bulinus truncatus*. Estas proteínas proporcionaron información relevante en relación a la estructura del nAChR (Smit y col. 2001; Smit y col. 2003; Celie y col. 2005; Hansen y col. 2005).

1. RECEPTOR NICOTÍNICO

1.1 Estructura

Los nAChRs constituyen una familia de receptores ionotrópicos implicados en un gran número de procesos fisiopatológicos (Bertrand y Gopalakrishnan 2007; Albuquerque y col. 2009; Hurst y col. 2013). Los nAChRs pertenecen a la superfamilia *Cys-loop* de canales iónicos activados por ligando en la cual se incluyen receptores ionotrópicos de GABA (A y C), glicina, glutamato (AMPA, NMDA y kainato) y serotonina (5-HT₃) (Taly y col. 2009; Miller y Smart 2010). La activación de todos ellos por un agonista

conduce a la apertura de un poro iónico que permite el paso de iones: cloruro (receptores GABA), sodio y/o calcio (nAChRs, AMPA, NMDA, Kainato, 5-HT₃).

Los nAChRs son complejos constituidos por 5 subunidades ensambladas alrededor de un poro iónico (Unwin 2005). Cada subunidad contiene: 1) un dominio N-terminal hidrofílico extracelular, de aproximadamente 200 aminoácidos (aa), donde reside el sitio de unión al ligando; 2) tres dominios transmembrana (M1-M3); 3) un largo bucle intracelular entre M3 y M4 y 4) un dominio transmembrana (M4) unido a la región C-terminal extracelular, la cual es relativamente corta (de Jonge y Ulloa 2007; Zoli y col. 2015) (Fig. 1).

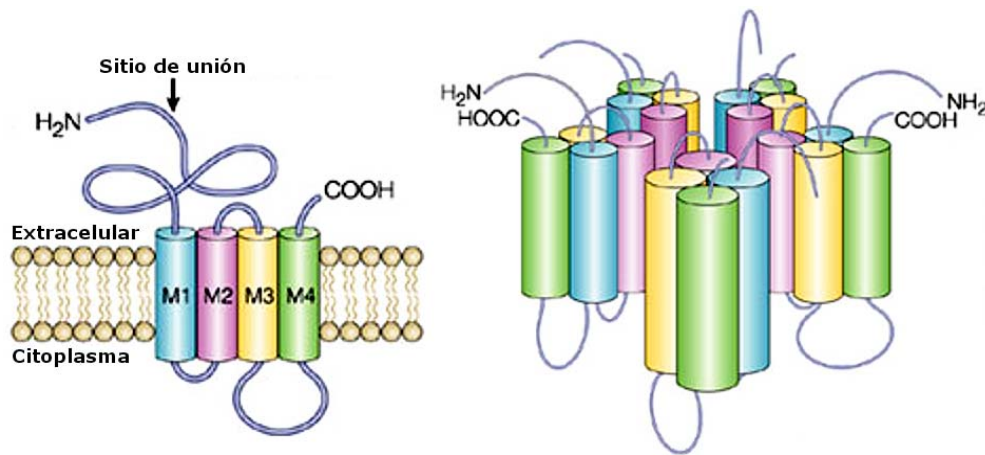


Figura 1: Esquema ilustrativo de la estructura del nAChR. A) Estructura terciaria de una subunidad nicotínica α donde se aprecian los 4 dominios transmembrana con un largo bucle citoplasmático entre M3-M4 y los dos dominios extracelulares N-terminal y C-terminal. B) Estructura cuaternaria del nAChR conformada por 5 subunidades nicotínicas; los segmentos transmembranales M2 de las distintas subunidades delimitan la pared del poro iónico. Adaptado de (Laviolette y van der Koo 2004)

El dominio N-terminal de la subunidad del nAChR posee una estructura en láminas β plegadas que se unen en la configuración de barril, así como un dominio α -hélice en su extremo. Por otra parte, los 25 primeros aa de la región N-terminal de cada subunidad contiene la zona del “péptido señal”, la cual es clave para que la proteína de nueva síntesis migre correctamente a la membrana celular. Los dominios M1-M4 y el bucle intracelular entre M3 y M4 tienen una configuración de α hélices. A través de experimentos de mutagénesis dirigida se ha podido demostrar que el segmento M2 es el encargado de tapizar la pared del poro y, por tanto, de proporcionar la selectividad y permeabilidad iónica características de cada subtipo de receptor (Changeux 2010; Zoli y col. 2015). De esta forma, el canal iónico estaría constituido por un anillo interior de 5 α

hélices, una por segmento M2 perteneciente a cada subunidad, que van curvándose radialmente hacia el interior para crear el poro. El bucle intracelular entre M3 y M4, que varía significativamente entre una subunidad y otra, posee sitios críticos de fosforilación que regulan el ensamblaje de las subunidades y modulan la actividad del nAChR (Colombo y col. 2013). Finalmente, en el receptor ya constituido, los segmentos M1 y M3 cubren al M2 alejándolo de la bicapa lipídica de la membrana, mientras que el M4 es el que queda más expuesto dicha bicapa (Zoli y col. 2015) (Fig. 1).

1.2 Genes que codifican las distintas subunidades del nAChR

Se han identificado 16 genes en el genoma humano que codifican para otras tantas subunidades del nAChR (Dani y Bertrand 2007). Estas subunidades se dividen en dos grupos: 1) subunidades α [$\alpha 1$ - $\alpha 10$, con excepción de la $\alpha 8$ expresada exclusivamente en aves (Gerzanich y col. 1994)] y 2) no- α ($\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ y ϵ). Las subunidades α contienen dos cisteínas adyacentes (análogas a las cisteínas 192 y 193 de la subunidad $\alpha 1$ del nAChR muscular) y separadas entre sí por 13 aa. Mientras tanto, las subunidades no- α carecen de estas dos cisteínas. Esta diferencia es fundamental ya que, en la zona de las cisteínas adyacentes, reside el sitio de unión del agonista (Fenster y col. 1997; Nai y col. 2003).

Los genes que codifican para las distintas subunidades del nAChR han divergido paulativamente a partir de un ancestro común por sucesivas mutaciones y duplicaciones, lo que ha conducido a la diversidad actual. Merece la pena destacar que los nAChRs han sido identificados en moluscos, equinodermos e insectos (van Nierop y col. 2005; Thany y col. 2007).

Los genes que codifican para las subunidades del nAChR se distribuyen en distintos cromosomas. Así, en el cromosoma 15 se encuentran el gen *CHRNA7* que codifica para la subunidad $\alpha 7$ y, formando un cluster, se encuentran los genes *CHRNA5* ($\alpha 5$), *CHRNA3* ($\alpha 3$) y *CHRNA4* ($\beta 4$). El resto de subunidades se ubican en los cromosomas 1 ($\beta 2$), 2 ($\alpha 1$, γ , δ), 4 ($\alpha 9$), 7 ($\alpha 6$ y $\beta 3$), 8 ($\alpha 2$), 10 ($\alpha 10$), 17 ($\beta 1$, ϵ) y 20 ($\alpha 4$) (Zoli y col. 2015).

1.3 Requerimientos estructurales del nAChR que condicionan su actividad

a) Sitios de unión al ligando

El sitio de unión al ligando o sitio ortostérico de cualquier subunidad α del nAChR comprende dos zonas bien diferenciadas: a) un componente principal constituido por las dos cisteínas adyacentes y los 4 aa (Tyr 93, Trp 149, Tyr 190 y Try 198) que conforman los bucles A.B y C; y b) un componente complementario que comprende los aa Leu 112, Met 114 y Trp 53, que conforman los bucles D, E y F (Corringer y col. 2000; Dougherty y Lester 2001) (Fig. 2B).

Las subunidades α contienen el componente principal del sitio de unión del ligando, mientras que las subunidades adyacentes (α en receptores homoméricos o β en receptores heteroméricos) proporcionan los sitios complementarios (Taly y col. 2009). La unión del agonista a ambos sitios del receptor es necesaria para que se abra el canal. Es de reseñar que las subunidad $\alpha 5$ y $\beta 3$ carecen de los aa necesarios para la unión del ligando y, por tanto, son consideradas como subunidades auxiliares (Gotti y Clementi 2004). Los nAChRs homoméricos poseen 5 sitios ortostéricos idénticos localizados en las interfases entre dos subunidades α adyacentes, mientras que los heteroméricos disponen de dos sitios localizados en la interfases α/β (Taly y col. 2009) (Fig. 2A).

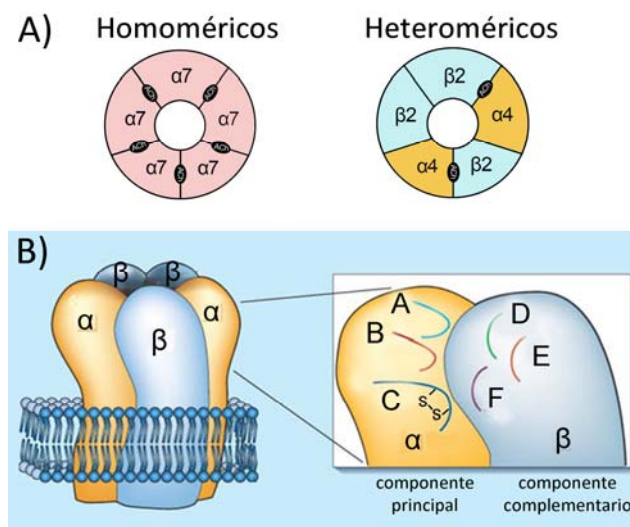


Figura 2: Sitios de unión al ligando en el nAChR. A) Localización de los sitios de unión del ligando en nAChRs de tipo homomérico (5 subunidades idénticas) o heteromérico (subunidades diferentes). B) Localización de los dos componentes (principal y complementario), con sus respectivos bucles, que integran la zona de unión del ligando al nAChR en n receptor heteromérico con sus respectivos bucles. Adaptado de (Gotti y Clementi, 2004 y Dougherty y Lester, 2001).

b) Estados funcionales del nAChR y fármacos que modulan su actividad

Como se ha mencionado previamente, se han identificado diversos dominios estructurales en el nAChR relacionados con el mecanismo de apertura y cierre (compuerta) del poro iónico, con el tiempo en el que el receptor permanece abierto y/o con el proceso de desensibilización. La unión del agonista provoca en el nAChR una serie de cambios conformacionales que conducen a la rotación de las subunidades y, consiguientemente, a la apertura del canal asociado.

Los nAChRs pueden encontrarse en tres estados conformacionales intercambiables distintos (Karlin y Akabas 1995; Hurst y col. 2013) (Fig. 3):

- Reposo: El receptor se encuentra cerrado por la ausencia de agonista.
- Abierto: Tras la unión del agonista, el receptor sufre un cambio conformacional que conduce a la apertura del poro iónico durante unas decenas de milisegundos.
- Desensibilizado: La presencia prolongada del agonista convierte al receptor activado en un estado desensibilizado en el que el canal iónico permanece cerrado (Quick y Lester 2002).

La transición entre los 3 estados es reversible y los diferentes fármacos tienden a estabilizar al receptor en uno u otro estado. Así, los agonistas estabilizan al nAChR en su estado abierto principalmente, mientras que los antagonistas competitivos lo estabilizan, preferentemente, en su estado cerrado.

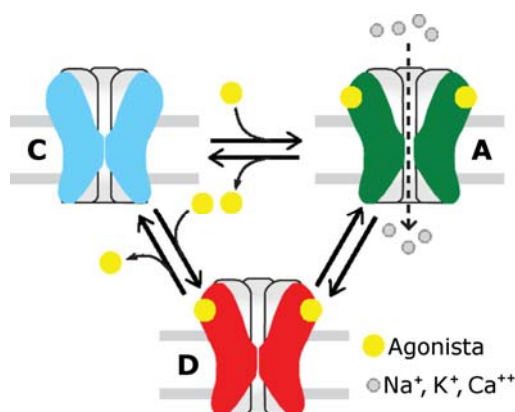


Figura 3: Representación esquemática de los diferentes estados cinéticos de los nAChRs. C=Cerrado; A=Abierto; D= desensibilizado. Se han descrito estados intermedios y, al menos, dos tipos de estados diferentes de desensibilización. Adaptado de (Corradi y Bouzat, 2016).

2. BIOGÉNESIS DE LOS nAChRs

La formación de nuevos de receptores funcionales es un proceso lento e ineficiente puesto que solo el 30 % de las nuevas subunidades sintetizadas en los ribosomas son capaces de formar receptores funcionales insertados en la membrana celular (Colombo y col. 2013). La traducción del ARNm en la secuencia polipeptídica de la subunidad se lleva a cabo por ribosomas insertados en la membrana del retículo endoplásmico (RE) (Alder y Johnson 2004). Posteriormente, se producen varias modificaciones postraduccionales que incluyen la escisión del péptido señal, la formación de puentes disulfuros y la glicosilación de residuos específicos (Blount y col. 1990). El proceso de glicosilación, imprescindible para un buen plegamiento de la proteína (Millar y Harkness 2008), se inicia durante la propia síntesis proteica y es el resultado de la unión de manosas en el dominio N-terminal de la subunidad. Estos oligosacáridos serán modificados posteriormente en el aparato de Golgi (Kornfeld y Kornfeld 1985; Chen y col. 1998).

La interacción con chaperonas residentes en el RE permitirá el plegamiento y la maduración de la subunidad y, por tanto, el futuro ensamblaje de la misma en la estructura pentamérica del nAChR (Wanamaker y col. 2003). De esta manera las chaperonas, a través de la estabilización y/o secuestro de subunidades nicotínicas, regularán el número de nAChRs funcionales formados conduciendo a las subunidades mal plegadas a su degradación por el proteosoma. Entre las chaperonas residentes del RE se encuentran BiP/GRP78 (proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina de la familia de proteínas Hsp70), calnexina y ERp57 (proteína del RE de 75 kDa), todas ellas aseguran el plegamiento correcto a la vez que retienen la cadena inmadura en el lumen. Otra chaperona residente en el RE es la denominada RiC3 (proteína resistente a los inhibidores de colinesterasa 3) que interacciona con distintas subunidades nicotínicas siendo imprescindible para el ensamblaje y formación del nAChR homomérico del subtipo $\alpha 7$ (Lansdell y col. 2005; Williams y col. 2005; Treinin 2008; Dau y col. 2013).

El RE, por sí mismo, es capaz de limitar el número de nAChRs expresados en membrana gracias a su capacidad para retener subunidades mal plegadas y/o ensambladas que finalmente serán degradadas (Colombo y col. 2013). A través de procesos de ubiquitinación, las subunidades mal plegadas son marcadas para ser degradadas en el proteosoma (Christianson y Green 2004). En este proceso intervienen también

chaperonas como la ubiquitina-1 que induce la degradación de subunidades al permitir la activación de la ubiquitina ligasa, o la chaperona UBXD4 que facilita la incorporación de nAChR a la membrana celular (Rezvani y col. 2010) (Fig. 4).

El bucle citosólico M3-M4 desempeña un papel clave en la salida de la subunidad desde el RE hacia la membrana plasmática. En la subunidad $\alpha 4$ se ha identificado un motivo conservado dentro del anterior bucle que es reconocido por la chaperona COPI cuando la subunidad está mal plegada, de forma que la chaperona impide su incorporación a membrana. Por el contrario, cuando la subunidad está bien conformada, el motivo queda inaccesible a COPI, con lo cual, la subunidad migra libremente hacia la membrana (O'Kelly y col. 2002).

Las chaperonas Rer1 y VILIP-1 del aparato de Golgi controlan el número final de nAChRs conteniendo subunidades $\alpha 4$ en la membrana celular (Zhao y col. 2009). Así, VILIP-1 es capaz de duplicar los receptores $\alpha 4\beta 2$ en membrana y triplica su sensibilidad a ACh (Fig. 4).

Los nAChRs migran almacenados en vesículas desde el RE al Aparato de Golgi y, desde este último hacia la membrana celular. Una vez el nAChR ha sido incorporado a la membrana, otras chaperonas también van a participar en la formación de agrupaciones de nAChRs (clusters) (Millar y Harkness 2008; Neff y col. 2009). Recientemente, se ha descrito como la chaperona NACHO no solo interviene en la maduración del $\alpha 7$ -nAChR en el aparato de Golgi si no que también regula su expresión en la superficie celular (Gu y col. 2016). La propia bicapa lipídica, a través del colesterol, parece afectar al tráfico de nAChRs, ya que el déficit de colesterol reduce el número de nAChRs en la membrana por un mecanismo de endocitosis (Borroni y col. 2007). La endocitosis también puede ser inducida por fármacos agonistas y antagonistas (como α -Bgtx), así como por algunos anticuerpos frente al nAChR (St. John 2009).

Para finalizar, resaltar también el hallazgo de que ciertas proteínas extracelulares pueden interactuar con nAChRs y modificar sus características. La chaperona lynx1 es capaz de disminuir la afinidad del $\alpha 4\beta 2$ por ACh, así como, el grado de desensibilización del receptor (Jones y col. 2010).

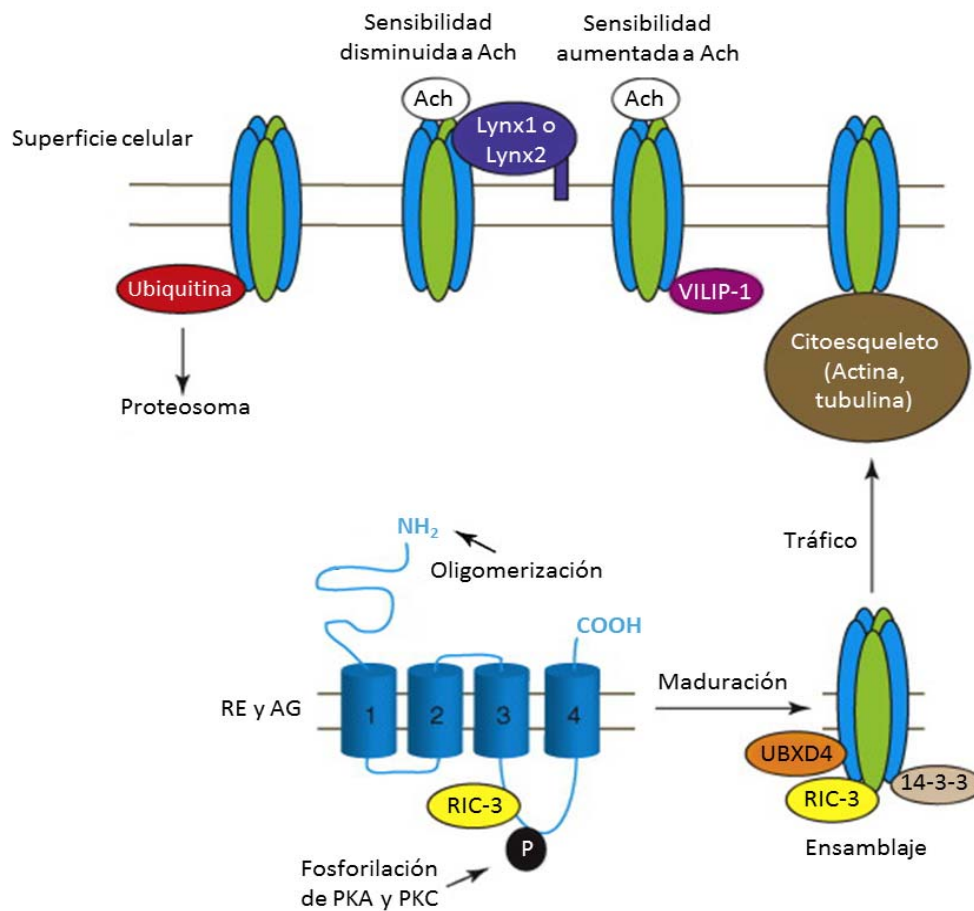


Figura 4: Participación de diferentes chaperonas en la biogénesis y tráfico de nAChRs hacia la membrana plasmática. Según su localización y el lugar del receptor al que se unan, las distintas chaperonas regularán desde el plegamiento y ensamblaje correcto hasta su inserción final en la membrana celular. Adaptado de (Andrew K Jones y col. 2010).

De todo lo anterior se puede deducir que cada tipo celular es capaz de emplear diferentes y múltiples mecanismos de control para regular la expresión en membrana de un número limitado de nAChR nativos (Gotti y col. 2006). Este proceso de control lo realizan a través de determinadas chaperonas, la concentración relativa de subunidades del nAChR y la afinidad intrínseca entre ellas. Estos mecanismos de control dependientes del tipo celular, explicarían la dificultad de expresar algunos subtipos de nAChR (por ejemplo $\alpha 7$ nAChR) en algunos modelos heterólogos de expresión y no en otros (Letchworth y Whiteaker 2011).

Una alteración en el tráfico de los nAChRs hacia la membrana celular ha sido implicada en la etiopatogenia de ciertas enfermedades. Tal es el caso de la enfermedad de Alzheimer donde se observa una disminución de nAChRs en el hipocampo y en la

neocorteza que podría deberse a la internalización de éstos inducida por la proteína β -amiloide (Nagele y col. 2002). En la miastenia gravis, enfermedad autoinmune, los anticuerpos producidos por los pacientes contra los propios nAChR musculares conducen a la internalización y degradación de los receptores y la consiguiente reducción de su número en la unión neuromusculares (Kuncl y col. 1993).

3. SUBTIPOS DE nAChRs NEURONALES: DISTRIBUCIÓN Y FARMACOLOGÍA

3.1 Clasificación de los nAChRs

Aunque el primer nAChR identificado fue el receptor muscular, constituido por las subunidades $(\alpha 1)_2 \beta 1, \delta, \epsilon$ (Mishina y col. 1986), en los años 80 se demostró la presencia de nAChRs en células de estirpe neuronal. A este último grupo de receptores denominados “nAChR neuronales” es al que nos vamos a referir a partir de ahora en esta tesis, salvo que se especifique otra cosa. Los nAChR se dividen en dos grandes subgrupos (Fig. 5):

- Sensibles a α -Bgtx: comprenden los nAChRs homoméricos ($\alpha 7$ y $\alpha 9$) o heteroméricos ($\alpha 9 \alpha 10$). Entre ellos, destacan los $\alpha 7$ -nAChR abundantemente expresados en el SNC (Gotti y Clementi 2004; Albuquerque y col. 2009), los cuales participan en funciones de tipo cognitivo tales como el aprendizaje y la memoria. Recientemente, ha sido demostrada también la existencia de receptores heteroméricos $\alpha 7 \beta 2$ presente en corteza cerebral (Moretti y col. 2014). Los $\alpha 9$ -nAChR homoméricos y los $\alpha 9 \alpha 10$ -nAChR heteroméricos poseen la característica particular de no ser estimulados, sino inhibidos, por nicotina, comportándose esta última como un antagonista de los mismos (Verbitsky y col. 2000).
- Insensibles a α -Bgtx: están formados por combinaciones de las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$ con las subunidades $\beta 2$ - $\beta 4$. Estos nAChR se unen con alta afinidad a la nicotina (Gotti y col. 2009; Changeux 2010). Las subunidades β de estos subtipos de nAChRs que no contienen el sitio de unión al ligando son denominadas “auxiliares” y entre sus efectos, se encuentran los de modificar las propiedades biofísicas y

farmacológicas del nAChR (Moroni y col. 2006; Tapia y col. 2007; Kuryatov y col. 2008; Moroni y col. 2008). Dentro de este subgrupo destaca el subtipo $\alpha 4\beta 2$ que constituye el 90 % de los nAChRs con alta afinidad por nicotina en el cerebro de mamíferos (Bertrnad y col. 1990). Mientras tanto, el $\alpha 3\beta 4$ es el principal subtipo en el sistema ganglionar y en la médula adrenal (Zoli y col. 2015).

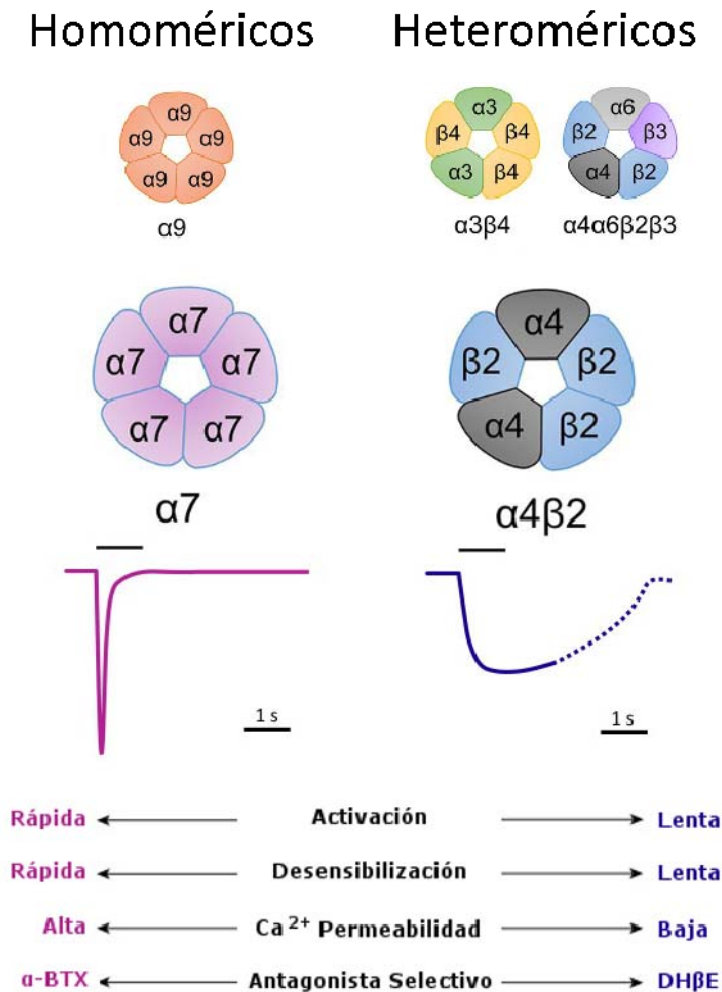


Figura 5: Representación esquemática de subtipos de nAChR neuronales. La figura muestra algunos de los principales subtipos de nAChR homoméricos ($\alpha 7$ y $\alpha 9$) y heteroméricos ($\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$) encontrados de forma nativa en las células. Clasificación de los receptores nicotínicos. La estimulación del subtipo $\alpha 7$ -nAChR por el agonista induce una respuesta rápida que se desensibiliza inmediatamente. Por otra parte, la activación del subtipo $\alpha 4\beta 2$ induce una respuesta de más lenta aparición y desaparición. α -BTX = α -bungarotoxina; DHβE = dihidro- β -eritroidina. Adaptado de (Dineley y col. 2015; Corradi y Bouzat 2016).

La asociación entre las distintas subunidades confiere propiedades funcionales y estructurales diferentes resultando en distintos subtipos de nAChR (Fenster y col. 1997; Nai y col. 2003).

3.2 Distribución de subunidades y principales subtipos de nAChRs

Los nAChRs se encuentran ampliamente distribuidos en SNC (Fig. 6), tanto en células neuronales como no neuronales, tales como astrocitos, microglía y oligodendrocitos (Egea y col. 2015). En los últimos años, se ha podido demostrar que no solo se expresan en células del SNC sino que también tienen localizaciones extracentrales en células y tejidos de naturaleza no neuronal; como queratinocitos, plaquetas, células del sistema inmune, células tumorales, epitelio intestinal, pulmonar y oral (Colombo y col. 2013). A continuación se detallará la distribución de subunidades y de algunos nAChRs conteniendo la subunidad marcada por el asterisco.

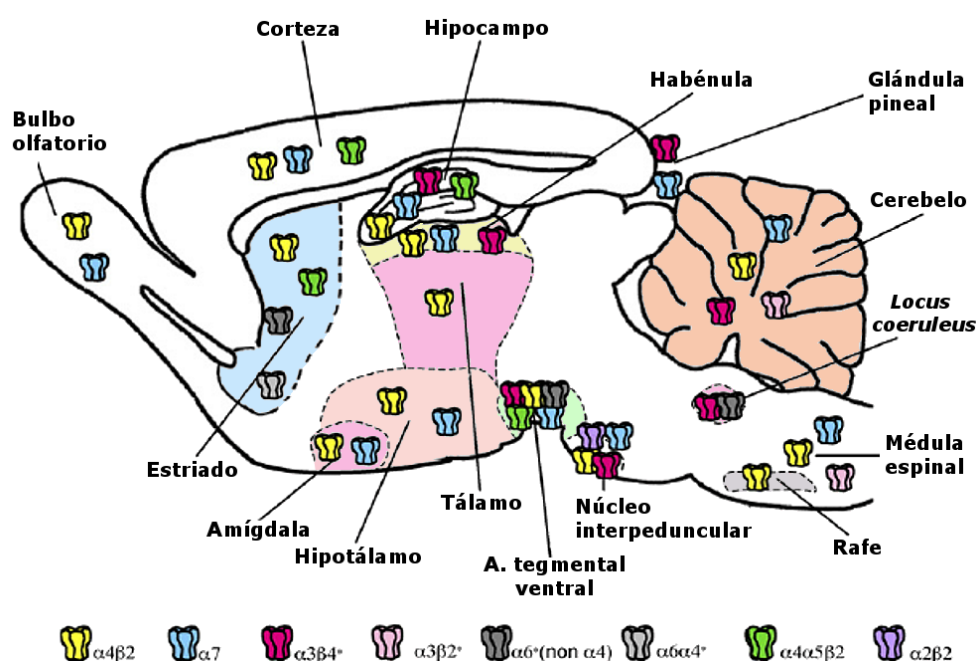


Figura 6: Distribución de distintos subtipos de nAChR en cerebro de ratón. Adaptado de (Gaimarri y col. 2007).

$\alpha 2^*$ -nAChR

La expresión de esta subunidad es muy variable, dependiendo de la especie. Así, es muy escasa en roedores donde solo se ha detectado su expresión, junto a la subunidad $\beta 2$, en retina (Moretti y col. 2004). En contraste, en monos, la subunidad $\alpha 2$ forma parte del 21 % de los nAChRs insensibles a α -Bgtx, constituyendo el subtipo $\alpha 2\alpha 4\beta 2$ (Quik y col. 2005). En humanos, esta subunidad está representada en un 10 % de los nAChRs

expresados en el área 21 de Brodmann (Gotti y col. 2006). Se ha descrito, en humanos, una mutación puntual de $\alpha 2$ asociada a un tipo de epilepsia nocturna de tipo hereditario, ADNFLE (del inglés *Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy*) (Aridon y col. 2006; Hoda y col. 2009)

$\alpha 4\beta 2$ -nAChR

El $\alpha 4\beta 2$ es el subtipo más abundante en el cerebro de mamíferos (Gotti y col. 2006) distribuyéndose por corteza, bulbo olfatorio, hipocampo, habénula media, tálamo, hipotálamo, amígdala, cuerpo estriado, núcleo interpeduncular, sustancia negra, área tegmental ventral (ATV), cerebelo, médula espinal y el núcleo del rafe. Dado que la estequiometría entre α y β condiciona la sensibilidad por el agonista y la permeabilidad al calcio (Tapia y col. 2007), se ha podido constatar que nAChRs con la estequiometría ($\alpha 4_3\beta 2_2$) poseen menor sensibilidad a ACh ($EC_{50} \approx 100 \mu M$) que aquellos con tres subunidades $\beta 2$ ($\alpha 4_2\beta 2_3$) ($EC_{50} \approx 1 \mu M$). Esta última es la combinación del nAChR nativo más abundantemente expresado en el SNC. El $\alpha 4\beta 2$ -nAChR ha sido implicado en los fenómenos de adicción al tabaco y dependencia, lo cual es lógico teniendo en cuenta su alta expresión en el “circuito de premio o recompensa” (Picciotto y col. 1995; Tapper y col. 2004; Lukas y Bencherif 2006). Este hallazgo ha llevado a considerar el $\alpha 4\beta 2$ -nAChR una diana terapéutica para el tratamiento de pacientes que deseen dejar de fumar. Este subtipo también ha sido asociado a enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, Parkinson y la epilepsia (Buckingham y col. 2009; Steinlein y Bertrand 2010).

Cluster *CHRNA3/CHRNA4/CHRNA5* ($\alpha 3/\beta 4/\alpha 5$)

Los genes que codifican para estas subunidades forman un cluster en el cromosoma 15 humano, lo cual sugiere una estrecha relación entre estos genes y sus elementos reguladores.

Los **$\alpha 3^*$ -nAChRs** desempeñan una importante función en el sistema nervioso autónomo (SNA) al estar directamente implicados en la transmisión sináptica ganglionar. De esta forma, el receptor $\alpha 3\beta 4$, expresado en neuronas ganglionares actúa sobre el control autonómico de órganos periféricos (Hernández y col. 2004). Este subtipo de nAChR es expresado en células cromafines de glándula adrenal y su actuación en dicha

localización es la inducción de la liberación de noradrenalina (NA) y adrenalina (A). El $\alpha 3^*$ -nAChR es también expresado en macrófagos (Zou y col. 2012) desde donde podría contribuir al control de la respuesta inflamatoria periférica. De hecho, este subtipo de receptor ha sido implicado recientemente en el control de la inflamación vascular (Yang y col. 2016). Es interesante la observación de que la elevada expresión de factores proinflamatorios (NF-kB) y ciertas citoquinas reduce la expresión de la subunidad $\alpha 3$ (Liao y col. 2016). En SNC, el $\alpha 3^*$ -nAChR participa en mecanismos de recompensa asociados a la adicción a nicotina, por lo que ha sido postulado que antagonistas del $\alpha 3\beta 4$ nAChR podrían ser potencialmente utilizados en tratamientos de adicción (Toll y col. 2012).

Estudios recientes han mostrado que los **$\beta 4^*$ -nAChR** se encuentran expresados en el bulbo olfatorio e hipotálamo (Zoli y col. 2015). El bulbo olfatorio recibe señales colinérgicas del área de Broca, lo cual sugiere que tanto la ACh como los nAChR podrían desempeñar un papel importante en la percepción del olor, en su discriminación y en el aprendizaje perceptual (Mandairon y col. 2006; Rushforth y col. 2010). Se ha identificado una población minoritaria de nAChRs conteniendo la subunidad $\beta 4$ en hipotálamo. La activación de estos receptores conduce en última instancia a efectos anorexigénicos y, por tanto, a la reducción de la ingesta de alimentos (Mineur y col. 2011).

La **subunidad $\alpha 5$** presenta una secuencia aminopeptídica con baja homología en comparación al resto de subunidades nicotínicas. La subunidad se expresa en SNC con una alta expresión en la habénula media (Heinemann y col. 1990) ATV (Gaimarri y col. 2007), y ganglios simpáticos y parasimpáticos (De Biasi 2002). Como se ha mencionado anteriormente, esta subunidad no puede generar nAChR funcionales por sí sola o combinada con subunidades β puesto que carece de sitio de unión para el ligando, por lo que, se comporta como subunidad auxiliar formando parte de los subtipos $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, y $\alpha 3\beta 4$. En estos últimos receptores, la subunidad $\alpha 5$ actúa modificando la permeabilidad al calcio, la afinidad del agonista por el receptor y la desensibilización del mismo (Kuryatov y col. 2008; Ramirez-Latorre y col. 1996). En los que se refiere a este último efecto, se ha observado que nAChRs conteniendo la subunidad $\alpha 5$ muestran menor desensibilización ante una exposición prolongada a nicotina. Es interesante la observación de que la subunidad $\alpha 5$ controle la expresión de las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ en ATV. En estos estudios vieron que en ratones $\alpha 5$ knockout presentan una disminución de

$\alpha 4^*$ -nAChR en el área cerebral anterior; dicho efecto es el resultado de un ensamblaje defectuoso de las subunidades que conforman el nAChR, lo que demuestra que la subunidad $\alpha 5$ facilita el ensamblaje de los mismos (Chatterjee y col. 2013).

El cluster *CHRNA3/CHRNA4/CHRNA5* ha sido asociado a ciertos fenotipos implicados en la dependencia a nicotina y en enfermedades relacionadas con el consumo de tabaco, como el cáncer de pulmón. Se ha descrito un polimorfismo sr16969968 de un solo nucleótido (SNP) en el gen *CHRNA5* asociado con un incremento en el riesgo de dependencia a nicotina (Saccone y col. 2009; Wen y col. 2016). Este resultado no es extraño dado que se ha descrito como la ingesta de nicotina en ratones $\alpha 5$ knockout incrementa marcadamente respecto a ratones control (Fowler y col. 2011), lo que sugiere que la subunidad está involucrada en la activación de los circuitos de recompensa.

$\alpha 6^*$ -nAChR

Los $\alpha 6^*$ -nAChR se encuentran expresados, principalmente, en el ATV y también en otras estructuras de los ganglios basales (núcleo accumbens y caudado putamen) (Gotti y col. 2005). Estos receptores han sido involucrados en procesos cognitivos (atención, control del humor), así como en la etiopatogenia de enfermedades neurodegenerativas (Shytle y col. 2002a; Wu y Lukas 2011). Dado el papel de la subunidad $\alpha 6$ en la regulación de la liberación de dopamina (DA), se ha propuesto su implicación en la enfermedad de Parkinson. De hecho, se ha encontrado una correlación entre la reducción de neuronas que contienen $\alpha 6^*$ -nAChR y la progresión de la enfermedad. En base a ello, se ha propuesto que agonistas de este subtipo de nAChR podrían mitigar los síntomas de la enfermedad (Quik y McIntosh 2006). La subunidad $\alpha 6$ también se encuentra expresada en estructuras neuronales relacionadas con la visión (retina, colículo superior y núcleo geniculado lateral) que expresan nAChRs incluyen los receptores $\alpha 6\beta 2\beta 3$ y $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ (Gotti y col. 2005).

$\alpha 7$ -nAChR

Este subtipo es uno de los más abundantes en SNC, aunque también profusamente expresado en muchos tipos celulares y tejidos de naturaleza no neuronal. Se caracteriza por tener alta permeabilidad al calcio y, tras su activación, es capaz de generar corrientes iónicas (como receptor ionotrópico que es) y/o desencadenar múltiples cascadas de

señalización mediadas o no por el calcio entrante. El $\alpha 7$ -nAChR ha sido implicado en múltiples procesos patológicos de tipo psiquiátrico, neurodegenerativo e inflamatorio, lo que ha conducido a considerar este subtipo de nAChR como una posible diana terapéutica (Corradi y Bouzat 2016). En los últimos años se ha identificado una duplicación parcial del gen *CHRNA7* que codifica para $\alpha 7$. El gen duplicado, *CHRFAM7A*, encontrado exclusivamente en humanos, codifica para una nueva subunidad **dup $\alpha 7$** , expresada en los mismos tipos celulares que $\alpha 7$ (Gault y col. 1998). Los conocimientos actuales sobre estas dos subunidades del nAChR se detallarán en una sección independiente posterior.

$\alpha 9^*$ -nAChR

La subunidad $\alpha 9$ presenta una localización muy restringida: las células ciliadas del oído interno, glándula pituitaria, epitelio olfatorio y cóclea principalmente (Kong y col. 2006; Elgoyhen y col. 1994). El $\alpha 9^*$ -nAChR es muy peculiar ya que se encuentra a medio camino entre los receptores muscarínicos y los nicotínicos a nivel de su sensibilidad farmacológica. En los últimos años, a este subtipo de receptor se le ha implicado en la percepción del dolor, por lo que las conotoxinas específicas frente a $\alpha 9$ podrían servir de modelo para el diseño de fármacos con potencial terapéutico en el dolor crónico (Lips y col. 2002; Kummer y col. 2008; McIntosh y col. 2009). Adicionalmente, es interesante resaltar que la regulación de la expresión de $\alpha 9$ parece ser controlada por mecanismos fisiológicos, como el estrés, tal como ha sido comprobado en médula adrenal en ratas (Colomer y col. 2010). Aunque la subunidad $\alpha 9$ forma receptores homoméricos nativos, también se ha demostrado que se puede ensamblar con subunidades $\alpha 10$ formando receptores heteroméricos capaces de generar corrientes mucho más grandes en respuesta a ACh que las producidas por $\alpha 9$ -nAChRs (Elgoyhen y col. 1994).

$\beta 3^*$ -nAChR

Esta subunidad, al igual que $\alpha 5$, carece de sitio de unión al ligando, por lo que es considerada también como una subunidad auxiliar, es capaz de modular y modificar las propiedades farmacológicas de los nAChR heteroméricos que la contienen (Boorman y col. 2003; Grinevich y col. 2005; Broadbent y col. 2006). La presencia de $\beta 3$ en el receptor $\alpha 6\beta 4\beta 3\alpha 5$ ejerce un efecto dominante negativo frente al nAChR carente de la misma; este efecto de la subunidad se produce por interferir con la expresión del nAChR

funcional en membrana (Palma y col. 1999). Por el contrario, ratones knockout para de $\beta 3$ presentan una disminución de la expresión de los $\alpha 6\beta 2$ -nAChR y $\alpha 4\alpha 6\beta 2$ -nAChR en los terminales nerviosos de las neuronas dopaminérgicas (Gotti y col. 2006), demostrando que $\beta 3$ debe ser importante para el ensamblaje, degradación de estos subtipos de nAChRs, así como para su transporte desde el cuerpo celular a los terminales nerviosos (Drenan y col. 2008).

3.3 Farmacología de los nAChRs

La mayoría de los agonistas nicotínicos disponibles hasta hace pocos años se caracterizaban por su falta de selectividad frente a un subtipo determinado de nAChR. Sin embargo, la reciente introducción de nuevos y selectivos agonistas frente a diferentes subtipos de nAChR junto con la disponibilidad de ratones knockout para subunidades concretas del nAChR, ha permitido identificar la implicación fisiológica de algunos de ellos.

La unión de los agonistas al sitio ortostérico del receptor desencadena cambios conformacionales en el mismo que conducen a la apertura del poro iónico. Agonistas puros y parciales tienen distinta actividad intrínseca o eficacia (Li y Steinbach 2010; Hurst y col. 2013). Los antagonistas competitivos también se unen al sitio ortostérico de manera reversible. Entre los antagonistas, se encuentran unos pocos compuestos naturales que han sido utilizados como herramienta para la identificación y caracterización de algunos subtipos de nAChR. Este sería el caso de los antagonistas del $\alpha 7$ -nAChR [metilicacónitina (MLA) y α -Bgtx]; también del antagonista del $\alpha 4\beta 2$ -nAChR [β -dihidroeritroidina (DH β E)] (Azam y McIntosh 2009; Armishaw y col. 2010; Muttenthaler y col. 2010).

Además del sitio ortostérico, se han identificado en el nAChR otros lugares de unión de fármacos no competitivos, tanto agonistas como antagonistas, así como de fijación de otras sustancias moduladoras (Paterson y Nordberg 2000) (Fig. 7). Básicamente, un antagonista no competitivo actúa bloqueando físicamente el poro o uniéndose a sitios cercanos a él para interferir con el tránsito de iones a su través. Utilizando este último mecanismo, el antagonista no selectivo mecamilamina bloquea la mayoría de nAChRs neuronales a concentraciones del rango de micromolar (μ M). Mención especial merecen los moduladores alostéricos del nAChR que, aunque no son capaces de activar por sí mismos el receptor, sí modifican la sensibilidad del mismo por

el agonista puro. De esta manera, los moduladores alostéricos positivos (MAP) son capaces de potenciar la respuesta inducida por agonistas (Changeux y Edelstein 2001) modificando la afinidad del agonista puro por el receptor, la pendiente de la curva dosis-respuesta y la amplitud de la respuesta máxima (Hurst y col. 2013). La disponibilidad del MAP constituye una nueva y excepcional herramienta experimental para el estudio del papel fisiopatológico de los nAChRs (Williams y col. 2011).

En relación con los MAP con interacción con el subtipo $\alpha 7$ -nAChR, se disponen en la actualidad de dos tipos. Así, los MAP tipo I (NS-1738) incrementan la respuesta inducida por el agonista puro sin modificar el curso temporal de la misma (Timmermann y col. 2007). Por otra parte, los MAP tipo II (PNU 120596) se caracterizan por reducir la desensibilización del receptor a través de un mecanismo que implica la estabilización del receptor en la conformación de su estado abierto (Gronlien y col. 2007). También, han sido identificados existen moduladores alostéricos negativos (MAN) que reducen la respuesta del nAChR inducida por el agonista (Yoshimura y col. 2007).

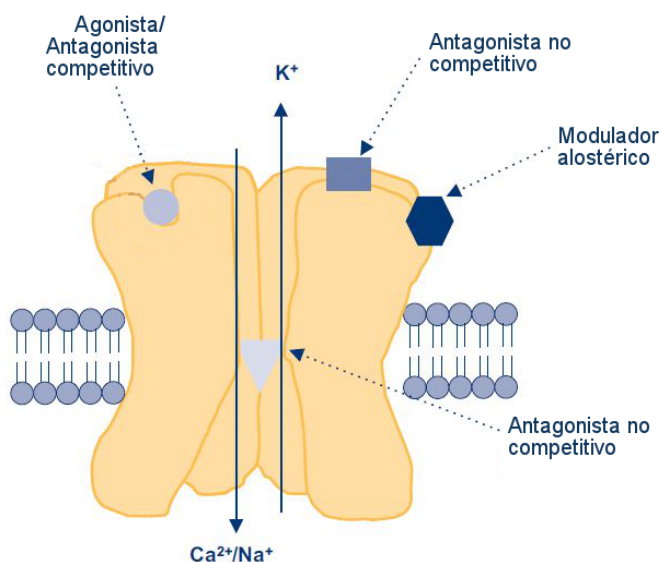


Figura 7: Sitios de unión para diferentes tipos de ligandos del nAChR neuronal. Representación esquemática del nAChR neuronal con los sitios de unión para diferentes ligandos farmacológicos. Agonistas y antagonistas competitivos se unen al sitio ortostérico, mientras que los antagonistas no competitivos tienen diferentes lugares de fijación. Adaptado de [Susan Wonnacott y Jacques Barik (TOCRIS)].

En la actualidad, los MAP constituyen una herramienta farmacológica para muchos grupos de investigación. Esto último se debe a aunar las siguientes propiedades (Corradi y Bouzat 2016): 1) incrementar las respuestas inducidas por la activación endógena; mantienen mejor las características de la activación endógena; 2) muestran gran selectividad; 3) permiten aflorar procesos fisiológicos inapreciables mediados por el nAChR; 4) reducen el fenómeno de desensibilización; y 5) actúan como protectores neuronales (Kalappa y col. 2013; Sun y col. 2013; Uteshev 2014).

4. LOCALIZACIÓN DE LOS nAChRs NEURONALES

Es bien conocido que una misma neurona puede expresar varios subtipos de nAChRs y que según sea la ubicación, así será la función que desempeñará (Fig. 8).

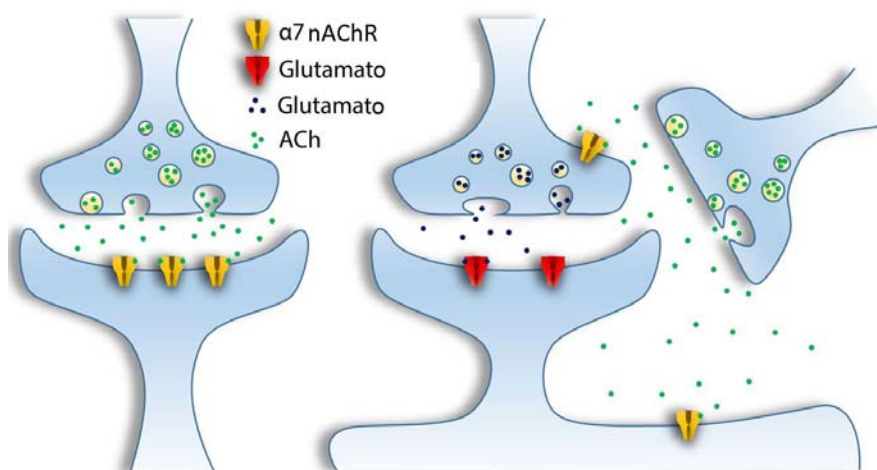


Figura 8: Localización postsináptica, presináptica y perisináptica del α7 nAChR. Adaptado de (Corradi y Bouzat 2016).

4.1 nAChRs presinápticos

La activación del nAChR presináptico del subtipo α7 por el neurotransmisor fisiológico ACh modula la liberación de neurotransmisores como la DA, NA, serotonina (5-HT₃), glutamato y GABA (Dani 2001; Dani y Bertrand 2007). Esta función de los α7-nAChRs presinápticos ha sido muy estudiado en hipocampo donde la activación del receptor induce la entrada de Ca²⁺ a través del ionóforo (Seguela y col. 1993), produce un incremento de [Ca²⁺]_i en la terminación presináptica y, consecuentemente, promueve la

liberación de glutamato o de GABA, dependiendo del tipo neuronal (McGehee y col. 1995; Gray y col. 1996). En terminales presinápticos dopaminérgicos, se ha constatado que el $\alpha 7$ -nAChR regula el tamaño del “pool” de vesículas sinápticas listas para secretar y, por tanto, la activación del receptor induce la liberación de la DA (Turner 2004). Una de las rutas de señalización puestas en marcha por el $\alpha 7$ -nAChR es la iniciada por el incremento de los niveles de AMPc que conduce a la activación de la proteína quinasa A (PKA) (Cheng y Yakel 2015). Esta última quinasa fosforila a la sinapsina I, proteína encargada de la unión de vesículas sinápticas a los filamentos de actina (Menegon y col. 2006; Cousin y Evans 2011). La activación de sinapsina I facilitará la liberación de glutamato a la sinapsis desde la terminal presináptica (Fig. 9). Esta ruta puesta en marcha por la activación de $\alpha 7$ -nAChR presináptico de neuronas glutamatérgicas, ha sido implicado en la potenciación a largo plazo en células granulares del giro dentado del hipocampo (Welsby y col. 2009) (Fig. 9).

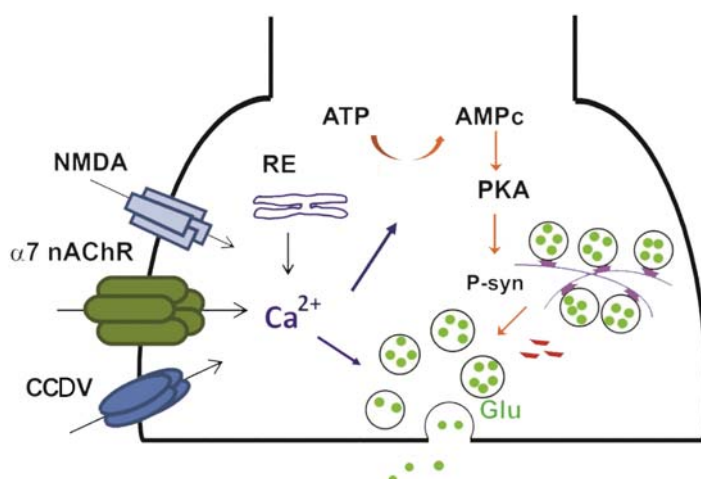


Figura 9: Mecanismos de modulación de la liberación de glutamato mediados por los $\alpha 7$ -nAChRs presinápticos. La concentración de Ca^{2+} intracelular aumenta por la entrada de estos cationes a través de los $\alpha 7$ -nAChRs, los canales de calcio dependiente de voltaje (CCDV) y el receptor ionotrópico de glutamato (NMDA). Este aumento de Ca^{2+} citosólico dispara la neurosecreción de glutamato directamente o, de forma indirecta, activando la ruta de señalización de AMPc-PKA, lo cual, permitirá una secreción más prolongada. Adaptado de (Quing Cheng y col. 2015).

Cambios en la plasticidad sináptica es otro de los efectos producidos por los $\alpha 7$ -nAChRs presinápticos. En el hipocampo de roedores, los $\alpha 7$ -nAChRs contribuyen a la organización dendrítica dentro de en neurona (Campbell y col. 2010). Esto se ha podido deducir a partir de los resultados obtenidos en ratones knockout $\alpha 7$, los cuales presentaron una reducida ramificación dendrítica en la capa CA1 y en neuronas

piramidales de la corteza durante el desarrollo posnatal (Morley y Mervis 2013). Este efecto parece deberse al papel desempeñado por el $\alpha 7$ -nAChR en la conversión de las sinapsis glutamatérgicas “silentes” a sinapsis “funcionales” (Maggi y col. 2003). En base a todos estos hallazgos, se ha hipotetizado que cambios en la expresión de nAChRs a nivel presináptico pueden tener consecuencias a nivel cognitivo (Hoyle y col. 2006; Young y col. 2007; Brown y col. 2010).

4.2 nAChRs axonales

Estos receptores, con una localización alejada de los terminales sinápticos, son capaces de modular la liberación de varios neurotransmisores simultáneamente (Dani 2001; Dani y Bertrand 2007). A diferencia de lo que ocurre con la liberación de neurotransmisores mediada por los nAChRs presinápticos, la liberación del neurotransmisor inducida por los receptores axonales puede bloquearse por tetrodotoxina (TTX), toxina producida por peces globo. El efecto de la toxina sobre la liberación se produce por bloqueo de los canales de Na^+ y, por tanto, la despolarización del terminal sináptico (Lena y col. 1993). Entre los subtipos de nAChRs expresados en terminales axónicos se encuentran aquellos que contiene la subunidad $\alpha 6$ presentes en neuronas dopaminérgicas del estriado (Champtiaux y col. 2003).

4.3 nAChRs postsinápticos

Los receptores con esta localización están implicados procesos de excitabilidad celular y de neurotransmisión rápida. La activación de nAChRs presentes en interneuronas de hipocampo intervienen en la compleja trama de activación e inhibición que ejercen las interneuronas sobre las neuronas piramidales (ver Fig. 13) (Ji y Dani 2000; Dani 2001; Dani y Bertrand 2007). Por otra parte, se ha demostrado que nAChRs postsinápticos están implicados en procesos de fosforilación y regulación de la expresión génica, de diferenciación celular y de supervivencia. Este es el caso de los $\alpha 7$ -nAChR postsinápticos que activan rutas de señalización que conducen a la fosforilación de CREB (la proteína de unión al elemento respuesta AMPc) y a los consiguientes cambios en la expresión génica de diversos genes (ver Fig. 10) (Hu y col. 2002).

5. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR LA ELEVACIÓN DEL $[Ca^{2+}]_i$ INDUCIDA POR nAChR

En reposo, la concentración extracelular de Ca^{2+} es del orden de 1-2 mM mientras que la $[Ca^{2+}]_i$ es de alrededor de 100 nM. Esta diferencia de concentración, sumada a la diferencia de potencial existente entre ambos lados de la membrana plasmática, hace que la aplicación de un estímulo provoque la entrada de Ca^{2+} al interior celular a favor del gradiente electroquímico. La activación del nAChR puede incrementar la $[Ca^{2+}]_i$ a través de 3 mecanismos: 1) entrada por el ionóforo del receptor; 2) a través de CCDV abiertos tras la despolarización generada por el estímulo; y 3) liberación de Ca^{2+} al citosol desde el RE como resultado de la activación de receptores de rianodina (RyRs) y de inositoltrifosfato (I_3 PRs) (Shen y Yakel 2009).

Los iones Ca^{2+} son uno de los mensajeros intracelulares más versátiles de los conocidos ya que el incremento de su concentración en citosol afecta a múltiples procesos celulares. De esta forma, el incremento de $[Ca^{2+}]_i$, interaccionando con diferentes proteínas, va a influir en la excitabilidad, exocitosis, motilidad, apoptosis y transcripción neuronal (Cheng y Lederer 2008). Más aún, la propia actividad del nAChR puede ser regulada por la $[Ca^{2+}]_i$, lo que sugiere una relación recíproca y compleja entre el ión y el receptor (Quick y Lester 2002; Khiroug y col. 2003).

La permeabilidad al Ca^{2+} del nAChR es una propiedad intrínseca de cada subtipo ya que está condicionada por las subunidades que conforman la estructura pentamérica del receptor. Ello explica que el valor del cociente de permeabilidad Ca^{2+} frente a Na^+ (Ca^{2+}/Na^+) sea de 2-5 para los nAChRs heteroméricos, valor que se incrementa en receptores conteniendo la subunidad $\alpha 5$ (Gerzanich y col. 1998; Fucile 2004). El anterior cociente alcanza un valor de 6-12 en el caso del $\alpha 7$ -nAChR homomérico, el subtipo con mejor permeabilidad para el Ca^{2+} (Fucile y col. 2003; Fucile 2004).

Independientemente de la vía de acceso de Ca^{2+} al interior celular, la activación de los nAChRs, y la consiguiente elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ pone en marcha un complejo entramado de señales intracelulares que desempeñan diversas funciones celulares (Dajas-Bailador y Wonnacott 2004) (Fig. 10). Es el caso del $\alpha 7$ -nAChR, el cual es capaz de modificar la expresión génica, la liberación de neurotransmisores y producir cambios de plasticidad neuronal, entre otros procesos, a través de cascadas de señalización disparas por $[Ca^{2+}]_i$.

Dos son las vías de señalización activadas por la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el $\alpha 7$ -nAChR (Fig.10). La primera se inicia con la activación de la CamKII/IV por el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la consiguiente activación de ERK/MAPK (ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; MAPK, serina/treonina quinasa activada por mitógenos) que conduce a la activación final de CREB. La segunda vía se inicia con la activación por Ca^{2+} de la adenilato ciclasa que produce un incremento de AMPc y la activación de la PKA. Esta última quinasa concluye con la primera vía a través de la fosforilación de CREB. La activación del CREB por cualquiera de estas dos rutas, regula la expresión de diversos genes. De hecho, se ha descrito que la expresión del gen que codifica para la enzima tirosina hidroxilasa (TH) está aumentada tras el tratamiento crónico con nicotina y que este aumento se produce por la activación de CREB mediada por el $\alpha 7$ -nAChR (Gueorguiev y col. 1999). De igual manera, la activación del $\alpha 7$ -nAChR que conduce a la fosforilación de CREB vía ERK/MAPK, está implicado en la plasticidad neuronal en SNC (Sweatt 2001).

El incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la activación de los $\alpha 7$ -nAChRs puede desencadenar procesos citotóxicos (Mechawar y col.2004) como neuroprotectores (Dajas-Bailador y col. 2000). Se ha demostrado que la toxicidad producida por exceso de glutamato es revertida gracias al efecto neuroprotector mediado por el $\alpha 7$ -nAChR. Este último efecto protector del $\alpha 7$ -nAChR se produce como consecuencia de la activación de JAK-2 (tirosina Janus-2) que, a su vez, fosforila a la PI3K, la cual activa a Akt (serina/treonina proteína kinasa) promoviendo mecanismos de supervivencia celular a través de las proteínas Bcl-2 y Bcl-x (Shaw y col. 2002; Shimohama 2009; Valles y Barrantes 2012).

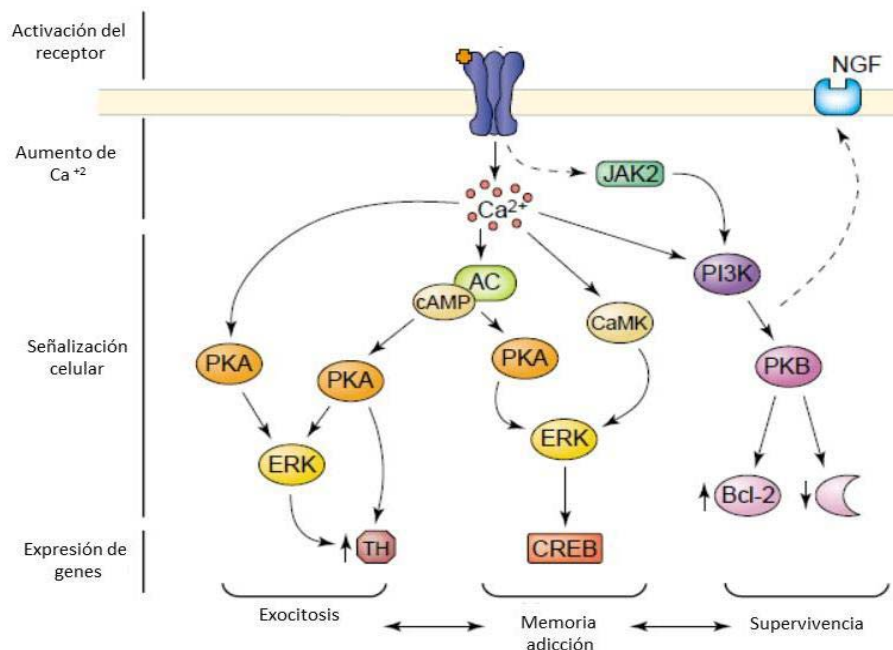


Figura 10: Representación esquemática de las vías de señalización intracelular puestas en marcha por los nAChRs a través del incremento de $[Ca^{2+}]$ implicadas en la regulación de diversas funciones neuronales por los nAChRs. El incremento de los niveles citosólicos de Ca^{2+} puede activar la enzima adenilato ciclasa (AC), la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa dependiente de calcio, la calmodulina quinasa II (CaMK II) o la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), activando así diversas rutas intracelulares de señalización. Entre los procesos regulados por la activación de estas rutas, se encuentran la exocitosis de neurotransmisores, así como aspectos relacionados con la memoria y el aprendizaje. También, existen rutas de señalización que controlan los procesos de muerte celular por apoptosis así como la activación de mecanismos de supervivencia. Adaptada de (Dajas-Bailador y Wonnacott 2004).

6. EXOCITOSIS: ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-SECRECIÓN

La exocitosis es el proceso fisiológico por el que se produce la liberación de neurotransmisores en respuesta a la elevación de $[Ca^{2+}]_i$. El anterior proceso requiere la fusión de las membranas de las vesículas sinápticas, cargadas de transmisores, y la superficie interna de la membrana citosólica (Nichols 2002). En el terminal sináptico, la unión del Ca^{2+} con la proteína sinaptotagmina (proteína acoplada a la vesícula y es considerada el sensor de Ca^{2+}) va a activar la maquinaria de exocitosis constituida por el complejo SNARE (del inglés, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) (Sudhof 1995; Calakos y Scheller 1996) (Fig. 11). El anterior complejo abarca 3 grupos de proteínas principales: sinaptobrevinas o VAMPs, syntaxinas y SNAP-25. El Ca^{2+} produce la apertura del poro de fusión de las vesículas que están preparadas para ser liberadas. Además, este ión también interviene coordinando el reciclado vesicular al acoplar las maquinarias de exocitosis y endocitosis, procesos ambos que se realizan en un rango de tiempo de milisegundos a segundos. El acoplamiento entre

exocitosis y endocitosis es clave para el mantenimiento de la transmisión sináptica. Cuando la tasa de fusión vesicular con la membrana plasmática es elevada, como podría ser el caso de una neurona disparando a alta frecuencia durante un período sostenido, es probable que el acoplamiento al que nos referimos anteriormente sea un factor limitante y, por lo tanto, un proceso susceptible de regulación (Wadel y col. 2007).

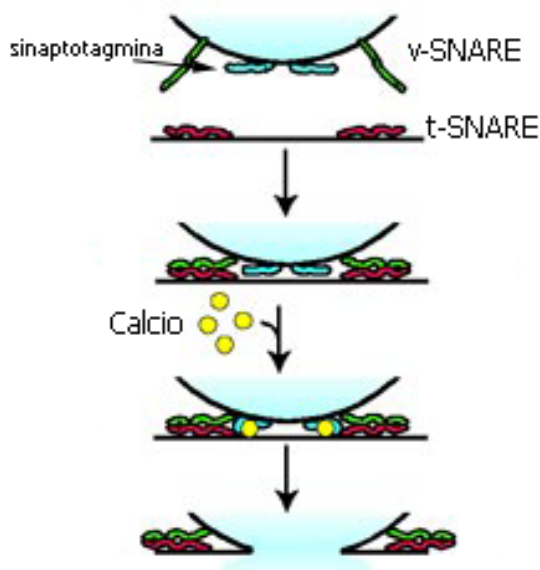


Figura 11: Exocitosis y calcio. Las vesículas sinápticas próximas a la membrana plasmática se unen a ella a través de las proteínas del complejo SNARE. La unión del Ca^{2+} a la sinaptotagmina dispara el proceso de fusión de las vesículas y, consecuentemente, la secreción. Adaptado de (Hilfiker S. y col. 1999).

7. EL RECEPTOR NICOTÍNICO DEL SUBTIPO $\alpha 7$

7.1 Papel fisiológico del $\alpha 7$ -nAChR

Este subtipo de nAChR representa uno de los más abundantes en SNC. Es especialmente expresado en regiones implicadas en funciones cognitivas y de memoria, como el hipocampo (zona CA1), la corteza (neuronas piramidales de las capas II, III, V y VI), así como algunas regiones subcorticales del sistema límbico (Court y col. 2000; Lendvai y col. 2013; Corradi y Bouzat 2016). El $\alpha 7$ -nAChR participa en la función cognitiva, la atención, el procesamiento de información sensorial, o en los procesos de premio o recompensa (Uteshev 2014). De hecho una reducción significativa del número de $\alpha 7$ -nAChR expresados en cerebro, concretamente, en hipocampo, ha sido encontrada en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Kadir y col. 2006) o en esquizofrenia (Schaaf 2014; Dineley y col. 2015).

Este receptor también es expresado en células de naturaleza no neuronal, como son los astrocitos, microglía, células precursoras de oligodendrocitos y células epiteliales, localizaciones donde el subtipo de nAChR juega un papel importante en procesos de inflamación y neuroprotección. El $\alpha 7$ -nAChR es también expresado en muchos tipos celulares fuera del SNC, como las células sanguíneas, queratinocitos, células endoteliales, células del sistema digestivo, células pulmonares, espermatogonias, linfocitos, monocitos, macrófagos y células de médula ósea (Yakel 2012; Dineley y col. 2015). El papel funcional del $\alpha 7$ -nAChR en estas últimas células está siendo investigado por muchos grupos y parece ser muy variado, dependiendo del tipo celular. Este papel parece estar relacionado con procesos de diferenciación, migración, adhesión, apoptosis, angiogénesis e inflamación (Ni y col. 2010; Egea y col. 2015; Zdanowski y col. 2015).

La concepción de que el $\alpha 7$ es un receptor dual ionotrópico/metabotrópico es bastante reciente y parece muy atractiva a la hora de abordar el estudio funcional del receptor (Kabbani y col. 2013) (Fig. 12). Datos recientes muestran que a través del poro iónico es capaz de unirse a proteínas $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ a través del bucle citoplasmático M3-M4 permitiendo así la activación de rutas de señalización durante un periodo de tiempo superior al conseguido por la elevación de $[Ca^{2+}]_i$ (Kabbani y col. 2013; King y col. 2015).

La señalización independiente de $[Ca^{2+}]_i$ mediada por el $\alpha 7$ -nAChR ha sido implicada en el efecto antiinflamatorio observado tras la activación de este subtipo de receptor. Dicho efecto, tal como se recoge en la figura 12, se produce a través de la vía JAK2/STAT-3 y NFkB (de Jonge y Ulloa 2007; Thomsen y Mikkelsen 2012) y en el crecimiento de neuritas (Nordman y Kabbani 2012; Kabbani y col. 2013).

Mutaciones del gen *CHRNA7* que codifica la subunidad $\alpha 7$, así como cambios de expresión del $\alpha 7$ -nAChR, han sido relacionadas con diversas enfermedades neurológicas y psiquiátricas. Así, se ha identificado un plegamiento aberrante de subunidades $\alpha 7$ que produce la alteración del tráfico del receptor a la membrana celular (Valles y Barrantes 2012). Otros estudios han identificado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y mutaciones del gen *CHRNA7* (Freedman y col. 1997; Leonard y col. 2002; Stephens y col. 2009) que conducen a una menor expresión del receptor. Se han descrito hasta 21 polimorfismos en la región promotora próxima (300 pb) al gen *CHRNA*, relacionados con la esquizofrenia y el déficit en el procesamiento de información sensorial (Leonard y col.

2002). Estudios postmortem han corroborado las anteriores observaciones al mostrar una disminución de sitios de fijación y de $\alpha 7$ ARNm en corteza frontal de pacientes esquizofrénicos (Freedman y col. 1995; Guan y col. 1999).

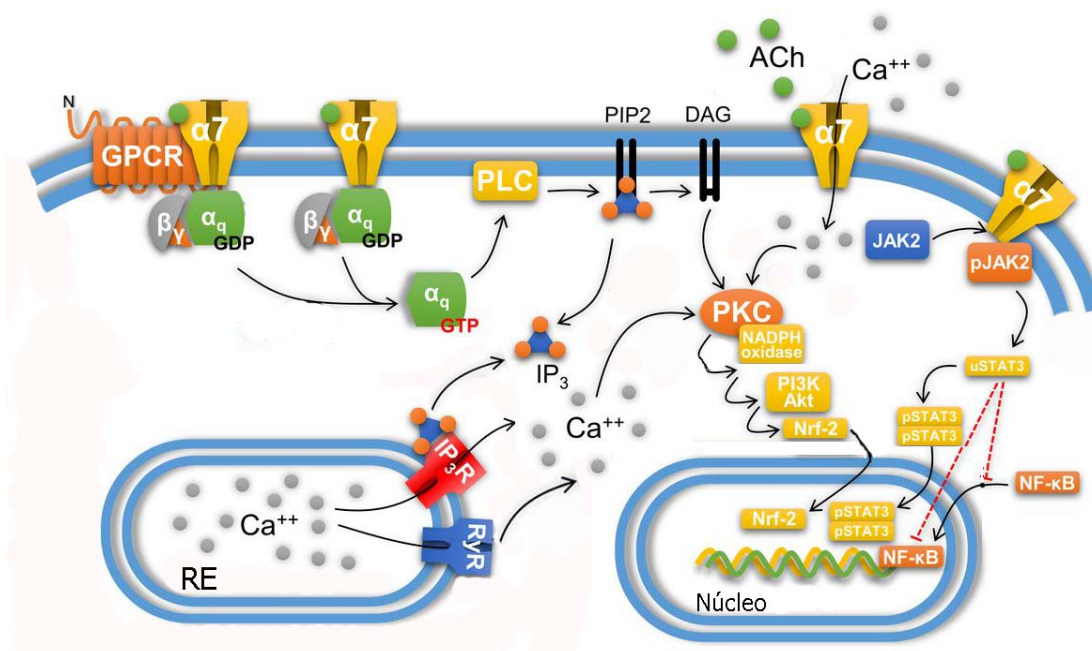


Figura 12: Naturaleza mixta del $\alpha 7$ -nAChR como receptor ionotrópico/metabotrópico y rutas de señalización independientes del Ca^{2+} citosólico. Como metabotrópico, $\alpha 7$ - nAChR activa señales intracelulares a través de la unión a proteínas G. En células inmunes, $\alpha 7$ -nAChR produce efectos antiinflamatorios a través de JAK2/STAT3 y la consiguiente reducción de la expresión de NF- κ B. Adaptado de (Corradi y Bouzat 2016).

El estudio del filtrado sensorial mediante potenciales evocados ha permitido, incrementar nuestro conocimiento sobre los mecanismos etiopatogénicos de la esquizofrenia. El filtrado sensorial es un mecanismo fisiológico de inhibición sensorial para eliminar estímulos irrelevantes y seleccionar aquellos de interés (Campbell y col. 2010). La onda p50 es un potencial evocado por un estímulo auditivo que se origina en el lóbulo temporal y en hipocampo. Esta onda recibe su denominación en base al tiempo (50 ms) que tarda en aparecer en el registro electroencefalográfico después de la aplicación del estímulo. El ensayo que se realiza para su valoración consiste en la aplicación de dos estímulos auditivos sucesivos (S1 y S2) y la medición de las dos ondas p50 generadas. Mientras que en sujetos normales se produce una reducción de la amplitud de la onda inducida por el segundo estímulo, en el sujeto esquizofrénico no se produce tal reducción debido al fallo de filtrado sensorial. El déficit de “filtrado sensorial p50” es normalizado

en esquizofrénicos y familiares tras el consumo de nicotina (Leonard y col., 1998), mientras que los antagonistas del $\alpha 7$ -nAChR agravan dicho déficit (Simosky y col., 2003). El mecanismo por el que los $\alpha 7$ -nAChRs se asocian con este déficit se debe a una disminución de su número en las interneuronas inhibitorias (Fig. 13).

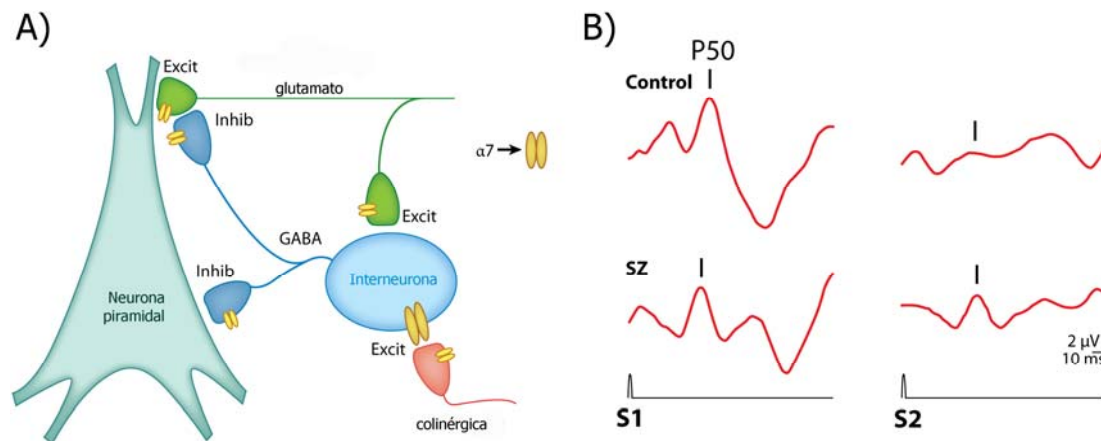


Figura 13: Mecanismo neuronal que subyace en el déficit sensorial en esquizofrenia. A) Las aferencias glutamatérgicas conducen la información sensorial del primer sonido (S1) excitando las neuronas piramidales que generan la onda P50. Una rama de la vía aferente glutamatérgica también excita a las interneuronas inhibitorias gabaérgicas que, de esta manera, inhiben a la neurona piramidal por una lado y la liberación glutamatérgica de la vía aferente por el otro. Esta doble inhibición a través de la interneurona disminuye la respuesta al segundo sonido (S2). La presencia del $\alpha 7$ -nAChR en las interneuronas es crítica para la funcionalidad de este circuito. B) Registros electrofisiológicos mostrando la inhibición de la onda P50 generada por S2 en un individuo sano y en el paciente esquizofrénico. Adaptado de (Freedman 2014).

7.2 El gen *CHRNA7* que codifica para la subunidad $\alpha 7$

La subunidad nicotínica $\alpha 7$ es una proteína de 503 aminoácidos codificada por el gen *CHRNA7*, el cual se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 15 (15q13-q14). Este gen, con un tamaño aproximado de 75 kb, está constituido por 10 exones que codifican para los diferentes dominios estructurales de la subunidad $\alpha 7$ (Fig. 14). Así, los exones 1 a 6 completos, y una parte del exón 7, codifican para el dominio N-terminal extracelular de la subunidad; en este dominio se localiza el sitio de unión al ligando (exones 2-6) y la región del péptido señal (exón 1) (de Jonge y Ulloa, 2007). El primer dominio transmembrana (M1) comienza en el exón 7, mientras que el resto de los segmentos transmembrana (M2-M4) están codificados por los exones 8-10 (Severance y col., 2004). El largo dominio citoplasmático (parte de los exones 9 y 10) es crucial para la expresión del receptor funcional (Mukherjee y col., 2009).

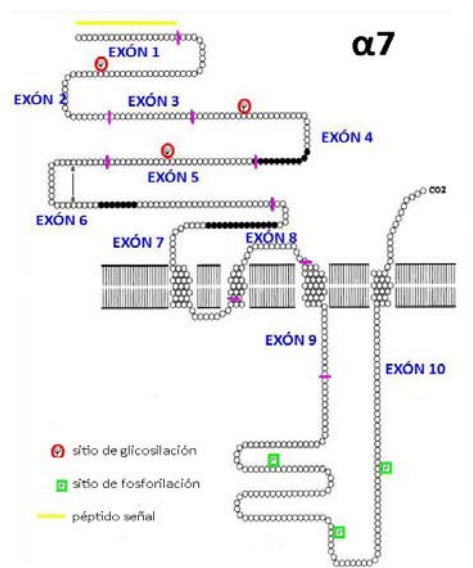


Figura 14: Exones del gen *CHRNA7* que codifica para la subunidad $\alpha 7$ del nAChR. Dominios estructurales de la subunidad $\alpha 7$ y exones que los codifican; en amarillo aparece la secuencia correspondiente al péptido señal.

El cromosoma 15 es uno de los cromosomas autosómicos que más duplicaciones segmentales presenta; esto es, regiones de más de 1 Kb con identidad con otras regiones del genoma mayor del 90 %. Así, el 8,8 % de la eucromatina del cromosoma 15 está compuesta por estas duplicaciones segmentales (Zody y col., 2006). Dentro de este cromosoma, la región cromosómica 15q11-14 es una de las que concentra más duplicaciones, además de tener gran interés fisiopatológico. Así, a través de estudios de ligamiento génico múltiple, se ha podido constatar que dicha región contribuye a la etiología de diversas patologías, como la esquizofrenia (Leonard y Freedman, 2006; Iwata y col., 2007), el trastorno bipolar (Hong y col., 2004; Flomen y col., 2006) y algunos tipos de epilepsia, como la epilepsia mioclónica juvenil (Taske y col., 2002).

Además, esta región cromosómica ha sido también implicada en la agenesia del cuerpo calloso con neuropatía periférica (Casaubon y col., 1996), así como en los síndromes de Prader-Willi y de Angelman (Christian y col., 1999; Boer y col., 2002). En esta región, a una distancia de 1.6 Mb del gen *CHRNA7*, hacia la región centromérica del cromosoma, se ha identificado un nuevo gen (*CHRFAM7A*) resultante de la duplicación parcial del gen *CHRNA7* que codifica para la subunidad nicotínica $\alpha 7$ (Gault y col., 1998; Riley y col., 2002).

8. LA SUBUNIDAD NICOTÍNICA $\text{dup}\alpha 7$: UNA NUEVA SUBUNIDAD DEL nAChR

8.1 El gen *CHRFAM7A*

El gen *CHRFAM7A* es el resultado de la fusión de un gen resultante de la duplicación parcial del gen *CHRNA* con el gen *FAM7A* que procede de una región duplicada en el cromosoma 3. El gen híbrido está localizado en el cromosoma 15, a una distancia de 1,6 Mb del gen *CHRNA* hacia la región centromérica (Gault y col. 1998; Riley y col. 2002). *CHRNA7* y *CHRFAM7A* son altamente homólogos (> 99 %) desde el exón 5 hasta la región 3' UTR del gen *CHRNA7* (Fig. 15).

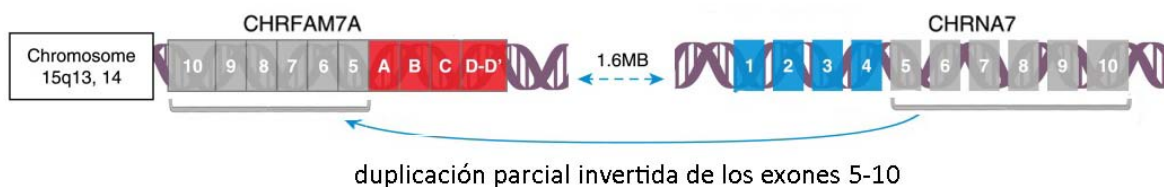


Figura 15: Localización de los genes *CHRNA7* y *CHRFAM7A* en el cromosoma 15. Las regiones homólogas entre los dos genes aparecen marcadas por la barra horizontal gris. En color, los exones divergentes entre los dos genes. Adaptado de (Costantini T.W. y col. 2015).

En el gen que codifica para $\text{dup}\alpha 7$, los exones 1-4 de *CHRNA7* han sido reemplazados por los exones D, C, B y A de *FAM7A* insertados en la secuencia del intrón 4 de *CHRNA7*, a unas 70 pb antes del exón 5. La duplicación del gen se acompañó de la inversión en su orientación, por lo que la lectura del gen duplicado se realiza en sentido contrario a la del *CHRNA7* (Gault y col. 1998). La adquisición de este gen híbrido parece ser un acontecimiento reciente en la evolución puesto que este gen solo aparece en humanos y no en otros primates superiores (Le Novere y col. 2002; Locke y col. 2003).

La mayoría de los individuos expresan dos copias del *CHRFAM7A*, aunque existe un grupo reducido de sujetos (5 % - 15 %) cuyos alelos no contienen este gen (Fig. 16). Se ha descrito también la existencia de un alelo conteniendo el gen híbrido con una delección de 2pb en el exón 6 (*CHRFAM7A-2 pb*) (Riley y col. 2002; Gault y col. 2003). Esta delección resulta de una mutación producida con posterioridad a la duplicación de *CHRNA7* ya que no se encuentra en el gen original (Flomen y col. 2006). Curiosamente, la delección de las 2pb produce un cambio de orientación del gen híbrido, que así

adquiere la orientación del gen *CHRNA7*. Se ha propuesto que la traducción del *CHRFAM7A-2pb* da lugar a una proteína trunca y, por tanto, carente de actividad funcional (Broadbent y col. 2006). La frecuencia de aparición del *CHRFAM7A-2pb* varía entre las diferentes etnias, siendo del 60 % en caucásicos, un 80 % en malayos y solo el 10 % en africanos bantúes (Riley y col. 2002). Desde el punto de vista fisiopatológico, este último polimorfismo ha sido asociado con algunos endofenotipos característicos de enfermedades psiquiátricas, como es el caso de la ausencia de la onda P50 en la esquizofrenia (Raux y col. 2002), o con el desorden bipolar, la enfermedad de Alzheimer o la demencia por cuerpos de Lewy (Guan y col. 1999; Kadir y col. 2006; Dineley y col. 2015).

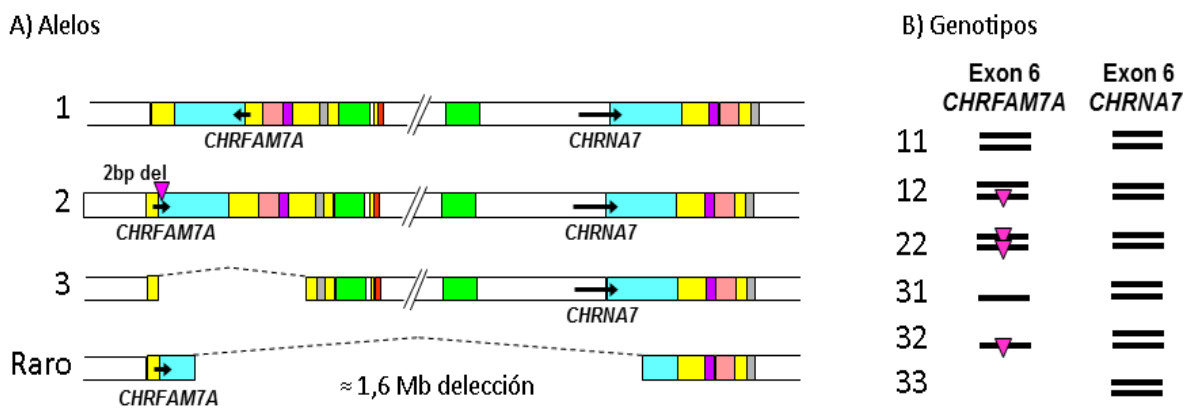


Figura 16: Polimorfismos de los genes *CHRNA7* y *CHRFAM7A* en la región 15q13-14. A) Alelos más comunes (1, 2 y 3) seguidos de un cuarto alelo (raro) que posee una microdelección poco frecuente (< 0,02 %) que contiene los siguientes 7 genes: *ARHGAP11B*, *MTMR10*, *MTMR15*, *TRPM1*, *KLF13*, *OTUD7A*, y *CHRNA7*. B) Mediante la secuenciación del exón 6 correspondiente a los genes *CHRFAM7A* y *CHRNA7*, en los alelos (1-3), revela 6 genotipos distintos en la población. Adaptado de (Flomen y col. 2008)

La expresión del *dupα7* ARNm se ha encontrado en multitud de órganos y células, tales como testículos, cerebro, colon, tumores, ojos, células inmunes y otros 30 tejidos diferentes (Costantini y col. 2015). La transcripción del gen *CHRFAM7A* produce hasta 11 transcritos diferentes, de los cuales, 8 son productos del procesamiento alternativo del ARNm. Sin embargo, solo 1 transcrito posee la secuencia consenso Kozak para poder ser traducido a proteína. La traducción de este último ARNm tiene una eficiencia muy baja

($\approx 5\%$) en comparación con la traducción del *CHRNA7* para producir el $\alpha 7$ ARNm (Wang y col. 2014).

Merece la pena resaltar la dificultad de determinar la expresión de los genes *CHRNA7* y *CHRFAM7A* debido a la alta homología en su secuencia nucleotídica y al hecho de que ambos son expresados en los mismos tipos celulares. Esto ha hecho que muchos de los datos existentes en la literatura evaluando la expresión de los mensajeros de $\alpha 7$ o $\text{dup}\alpha 7$, sean erróneos, al no utilizar cebadores selectivos para uno u otro ARNm, y también por la carencia de anticuerpos capaces de discriminar entre una u otra subunidad nicotínica.

8.2 La subunidad $\text{dup}\alpha 7$

La proteína codificada por *CHRFAM7A* tiene un tamaño de 412 aa y un peso aproximado de 45 kDa (Thierry-Mieg y Thierry-Mieg 2006). El codón AUG de inicio de traducción se encuentra en el exón B y la subunidad peptídica resultante muestra una región N-terminal acortada que ha perdido la zona del péptido señal y el sitio de unión al ligando. Consecuentemente, la migración de la subunidad desde el RE a la membrana se ve comprometida, lo que implica que su localización debe ser intracitoplasmática, preferentemente (Gault y col. 1998). Dado que el transcrito de $\text{dup}\alpha 7$ conserva los exones 5-10 de la subunidad $\alpha 7$, la subunidad aún conserva las 4 regiones transmembrana, el largo bucle intracelular M3-M4 y el C-terminal extracelular. Por todo ello, la subunidad $\text{dup}\alpha 7$ tiene la capacidad de poder ensamblarse con otras subunidades nicotínicas para formar la estructura pentamérica del nAChR, ejerciendo de esta manera, funciones reguladoras (Gault y col. 2003; van Maanen y col. 2009; Araud y col. 2011; Benfante y col. 2011; de Lucas-Cerrillo y col. 2011) (Fig. 17).

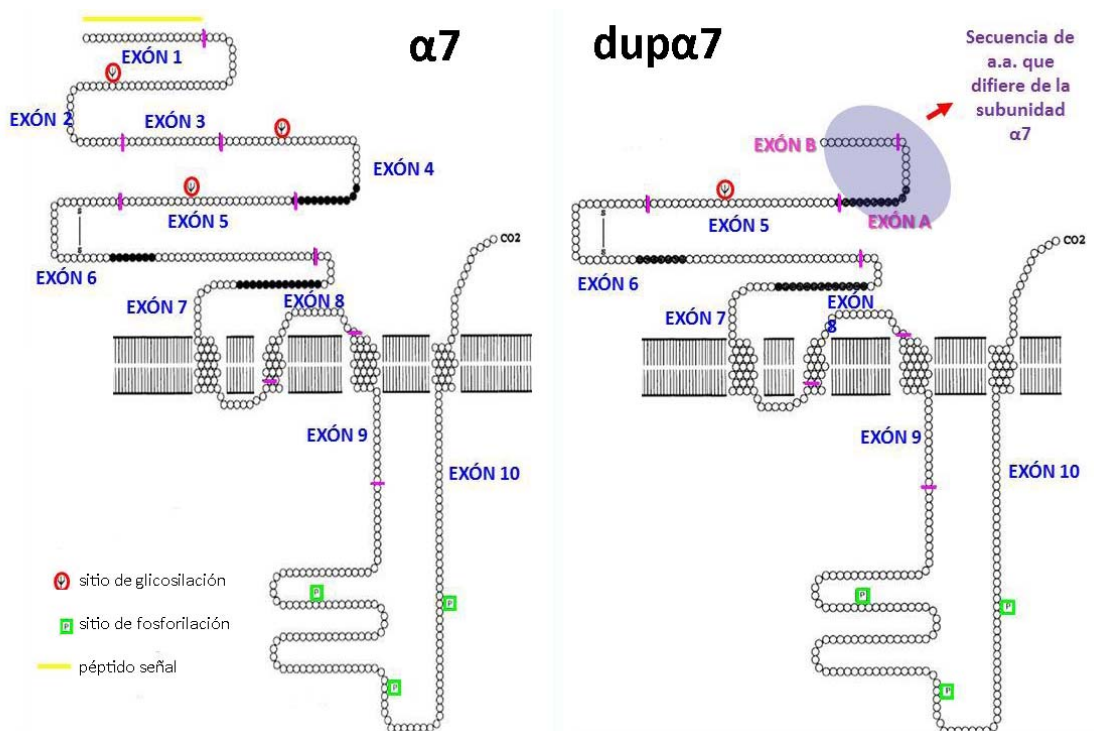


Figura 17: Esquema comparativo de la estructura terciaria de las subunidades $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ junto con los exones de los respectivos genes que codifican dicha estructura. Obsérvese la homología entre las subunidades desde el exón 5 hasta el 10, así como las divergencias existentes en el N-terminal. Adaptado de (Gault y col. 1998).

8.3 Papel funcional de la subunidad $\text{dup}\alpha 7$

A pesar de haberse identificado el gen que codifica esta subunidad en 1998 (Gault y col. 1998), durante muchos años no se supo si el ARNm codificado por el *CHRFAM7A* se traducía a proteína y, en caso afirmativo, cuál era su función. La primera respuesta a estas dos cuestiones vino de la mano de nuestro grupo que logró constatar la traducción del $\text{dup}\alpha 7$ ARNm a proteína y determinar la función de esta última en un sistema de expresión heterólogo, como es el de los ovocitos de *Xenopus laevis* (de Lucas y col. 2011). La principal aportación de nuestro trabajo, fue descubrir que $\text{dup}\alpha 7$ actúa como modulador dominante negativo sobre la actividad del $\alpha 7$ -nAChR. Así, el incremento de la proporción de $\text{dup}\alpha 7$ ARNm cuando se coinyectaba junto con $\alpha 7$ ARNm producía una disminución de las corrientes inducidas por nicotina en los ovocitos (Fig. 18). Dicho efecto de $\text{dup}\alpha 7$ era concentración-dependiente.

La función de $\text{dup}\alpha 7$ como modulador negativo de la actividad del $\alpha 7$ -nAChR fue corroborada unos meses más tarde por otro grupo (Araud y col. 2011). Dado que el

$\alpha 7$ -nAChR ejerce múltiples funciones en el organismo, cabría preguntarse si $\text{dup}\alpha 7$ desempeña algún papel fisiopatológico al interferir con alguna de ellas. Para ello, la expresión de $\text{dup}\alpha 7$ deberá ser susceptible de modulación por distintos estímulos.

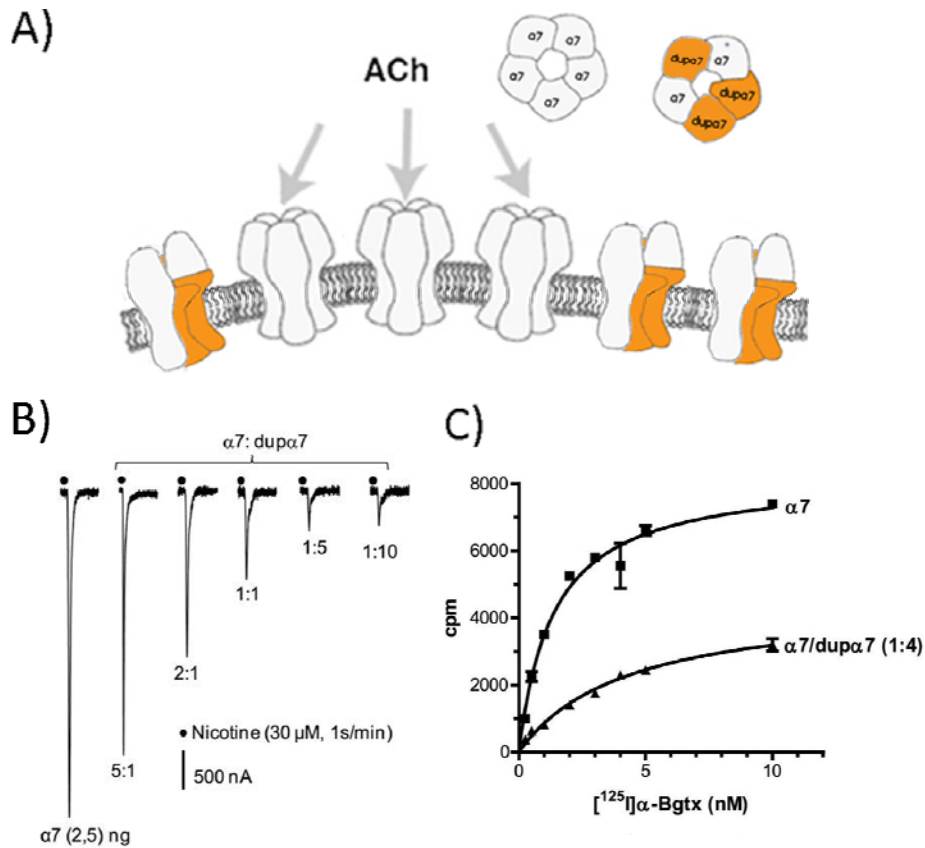


Figura 18: Efecto modulador dominante negativo de $\text{dup}\alpha 7$ sobre la actividad del $\alpha 7$ -nAChR. A) esquema ilustrativo de la estructura pentamérica del $\alpha 7$ -nAChR antes y después de la inserción de la subunidad $\text{dup}\alpha 7$. B) Registros originales de las corrientes inducidas por pulsos de nicotina aplicados a ovocitos inyectados con distintas proporciones de los mensajeros de $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ ($\alpha 7:\text{dup}\alpha 7$). La corriente control es la obtenida en el ovocito inyectado solo con $\alpha 7$ ARNm (primer registro). Se observa una disminución de la corriente inducida por nicotina de forma concentración-dependiente, en función del $\text{dup}\alpha 7$ ARNm inyectado. C) El anterior efecto de $\text{dup}\alpha 7$ sobre las corrientes mediadas por el $\alpha 7$ -nAChR se debe a la reducción del número de receptores funcionales, lo cual se midió a través de la reducción de sitios de unión de α -Bgtx. Adaptado de (Lucas-Cerrillo y col. 2011).

Una vez demostrado el efecto modulador de $\text{dup}\alpha 7$ sobre el $\alpha 7$ -nAChR en ovocitos de *Xenopus*, la siguiente pregunta que nos planteamos fue analizar si esta interacción funcional se producía también en células de mamíferos. Nuestros resultados han demostrado que este es el caso. Así, la estimulación de las células con LPS produjo la translocación del factor de transcripción NF- κB al núcleo, efecto que fue revertido en células preincubadas con nicotina. El efecto de nicotina sobre NF- κB no se observó en células transfectadas transitoriamente con $\text{dup}\alpha 7$ y estimuladas con LPS. Así en estas

células se permitió la translocación de NF- κ B al núcleo y la transcripción de genes de moduladores inflamatorios. La repercusión final fue observada mediante la liberación de la citoquina TNF α por parte de los macrófagos transfectados con dup α 7-myc mediada por ELISA (Fig. 19).

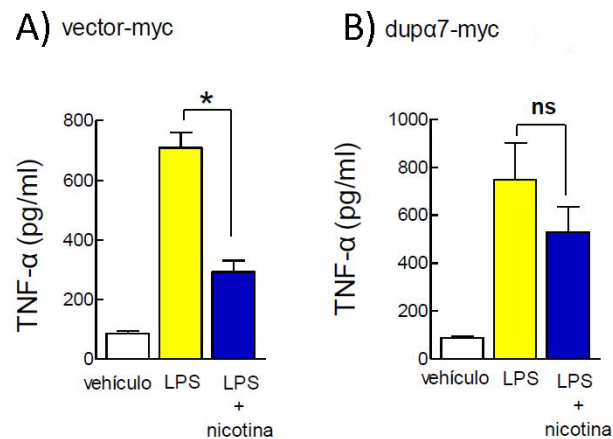


Figura 19: La expresión de dup α 7 revierte parcialmente el efecto antiinflamatorio de nicotina mediado por el α 7-nAChR. El efecto se produce al interferir con la traslocación al núcleo de NF- κ B reduciendo la producción de TNF α . Tomado de (Maldifassi 2014).

9. EL α 7-nAChR DE MACRÓFAGOS Y SU PAPEL FUNCIONAL EN EL CONTROL DE LA INFLAMACIÓN: VIA COLINÉRGICA ANTIINFLAMATORIA

El sistema inmune innato de los vertebrados detecta señales exógenas y endógenas de peligro a través de complejos mecanismos humorales y celulares, emitiendo una serie de respuestas que son críticas para proteger al huésped de los agentes patógenos o del daño tisular. No obstante, si la respuesta inmune innata es excesiva, ésta puede llegar a ser más peligrosa que el estímulo lesivo original. Para contrarrestar el exceso de respuesta inflamatoria por parte del sistema inmune, el organismo dispone de una serie de mecanismos antiinflamatorios. Entre estos mecanismos, se encuentra la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal que conduce a una respuesta antiinflamatoria muy efectiva pero relativamente lenta y no específica. En los últimos años, el grupo de Kevin Tracey ha identificado un circuito neuronal antiinflamatorio conectado directamente con el sistema inmune. Este circuito, denominado 'reflejo inflamatorio', ha sido

extensivamente estudiado por el anterior grupo y por muchos otros reputados investigadores (Borovikova y col. 2000; Huston y col. 2006; Rosas-Ballina y col. 2008; Rosas-Ballina y col. 2011). El circuito está compuesto por fibras aferentes (sensitivas) del nervio vago que detectan señales moleculares periféricas de daño tisular o infección (interleuquina-1 (IL-1), endotoxina, etc) y señalizan del daño a ciertos núcleos del tronco cerebral. La estimulación de estos núcleos genera una respuesta antiinflamatoria que viaja a través de fibras eferentes (motoras) del nervio vago, llegando al bazo y a otros tejidos y órganos del sistema fagocítico mononuclear, donde se consigue inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias por los macrófagos residentes (Fig. 20).

Las bases moleculares de la anterior respuesta antiinflamatoria mediada por el nervio vago eferente, denominada ‘vía colinérgica antiinflamatoria’ (CAP, acrónimo del término inglés ‘*cholinergic antiinflammatory pathway*’), han ido desvelándose gracias a numerosos estudios publicados en los últimos años, algunos de cuyos resultados han sido realmente sorprendentes e inesperados, tal como se describe a continuación (Fig. 21). La rama eferente del vago se comunica con el bazo a través del nervio esplénico que libera el neurotransmisor noradrenalina (NA). La NA interactúa con receptores β -adrenérgicos (β -AR) expresados en células T sintetizadoras de ACh, produciéndose la liberación de este transmisor y su interacción con $\alpha 7$ -nAChRs expresados en macrófagos del bazo productores de citoquinas (Rosas-Ballina y col., 2011). Por tanto, el punto culminante de este mecanismo antiinflamatorio radica en la interacción final de ACh con los $\alpha 7$ -nAChRs de los macrófagos y otras células inmunes, lo cual se traduce en una reducción de la producción de citoquinas proinflamatorias desde estas células (Wang y col., 2003; 2004).

El papel tan relevante desempeñado por los $\alpha 7$ -nAChRs de macrófagos en el contexto de la CAP fue puesto de manifiesto, por primera vez, por el grupo de Wang (Wang y col. 2003) y posteriormente refrendado por diversos investigadores (Wang y col. 2004; Ghia y col. 2006; van Westerloo y col. 2006). En el primer estudio, los autores demostraron la presencia del $\alpha 7$ -nAChR en macrófagos humanos diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica utilizando α -Bgtx marcada con fluoresceína-isotiocianato (FITC) y técnicas de microscopía confocal. La identidad de la subunidad nicotínica expresada por los macrófagos fue confirmada posteriormente tras el clonaje y secuenciación del ADNc completo de la misma; la subunidad de macrófagos contenía los exones 1 al 10, idénticos a los de la subunidad $\alpha 7$ neuronal.

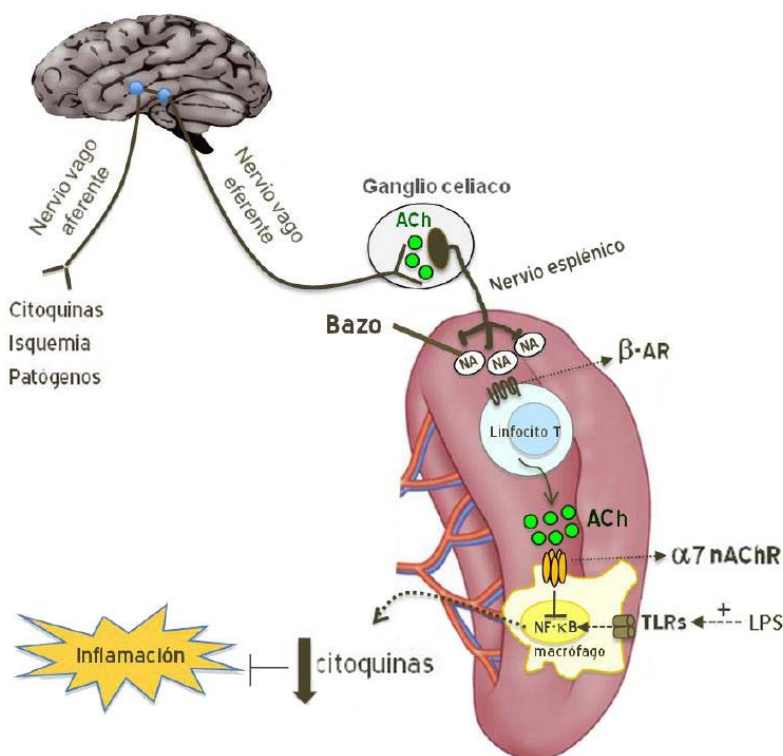


Figura 20: Representación esquemática del circuito neuronal conocido como 'reflejo inflamatorio' a través del nervio vago. La rama derecha del circuito se denomina 'vía colinérgica antiinflamatoria' y es la que finalmente se encarga de contrarrestar el exceso de inflamación a través de la interacción de ACh con $\alpha 7$ -nAChRs de macrófagos residentes en bazo y otros órganos del sistema fagocítico mononuclear. β -AR: receptores β adrenérgicos; TLRs: receptores de tipo Toll; DAMPs: patrones moleculares asociados a daño; PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos; LPS: lipopolisacárido. Adaptada de (Cedillo y col., 2015).

La estimulación del nervio vago, o la administración de ACh, nicotina u otros agonistas nicotínicos, inhibía la producción del factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), así como de las interleuquinas IL-1 β , IL-6, IL-8 y la proteína HMGB1 (del inglés *High Mobility Group Box1*), en macrófagos humanos y de ratón estimulados con LPS (Wang y col. 2003; Wang y col. 2004; Ghia y col. 2006; van Westerloo y col. 2006). Que el $\alpha 7$ -nAChR es el responsable último de este efecto se deduce por la reducción del efecto antiinflamatorio de estos agonistas nicotínicos en macrófagos transfectados con el oligonucleótido antisentido frente a la subunidad $\alpha 7$, o en células incubadas con α -Bgtx, bloqueante irreversible de este subtipo de receptor (Wang y col. 2003; Yoshikawa y col. 2006). Adicionalmente, experimentos *in vivo* realizados en ratones mostraban que la estimulación del nervio vago eferente reducía significativamente los niveles plasmáticos de citoquinas inducidos por LPS, mientras que dicha estimulación no producía efecto alguno en ratones deficientes para la subunidad $\alpha 7$ (Wang y col. 2003).

Existen muchos estudios *in vitro* demostrando los efectos inmunosupresores de los agonistas del $\alpha 7$ -nAChR en cultivos de macrófagos humanos y roedores estimulados con LPS. Estos resultados han podido ser también corroborados en diversos modelos de inflamación sistémica en roedores, incluyendo sepsis, pancreatitis, shock hemorrágico, lesión de isquemia-reperfusión o íleo postoperatorio (Borovikova y col. 2000; Wang y col. 2003; Wang y col. 2004; de Jonge y col. 2005; Pavlov y col. 2006; Tracey 2007; van der Zanden y col. 2009; Ulloa 2013). En estos modelos experimentales, la estimulación del nervio vago eferente redujo la producción de citoquinas proinflamatorias, confiriendo protección frente al daño tisular e incrementando la supervivencia (Wang y col. 2004; Huston y col. 2007). Por el contrario, la vagotomía abdominal selectiva o la esplenectomía revertían los efectos antiinflamatorios de la estimulación del nervio vago o de los agonistas del $\alpha 7$ -nAChR (Borovikova y col. 2000; Huston y col. 2006). Más aún, hallazgos recientes de nuestro grupo, derivados de un estudio piloto realizado con pacientes sépticos, han puesto de manifiesto, por primera vez, la importancia de una actividad adecuada de CAP en la evolución y pronóstico de la sepsis (Cedillo y col. 2015).

El descubrimiento de que la CAP jugaba un papel relevante en el control de la inflamación ha promovido el estudio de las vías de señalización implicadas en el efecto antiinflamatorio mediado por el $\alpha 7$ -nAChR. Los resultados obtenidos revelan la implicación de varias vías de señalización que, directa o indirectamente, conducen a la inhibición de la actividad de NF-kB y/o a la activación de STAT3, dos factores de transcripción centrales en la inmunidad innata y adaptativa (Wang y col. 2004; de Jonge y col. 2005; Arredondo y col. 2006). Nuestro grupo ha identificado recientemente una nueva vía de señalización que conecta el $\alpha 7$ -nAChR con NF-kB en macrófagos humanos y que implica al modulador negativo de la inflamación IRAK-M (serina/treonina quinasa-M asociada al receptor de interleuquina-1) (Maldifassi y col. 2014).

En conjunto, todos los datos expuestos anteriormente permiten intuir que la CAP, con el $\alpha 7$ -nAChR a la cabeza, parece desempeñar un papel fisiopatológico crucial en enfermedades inflamatorias sistémicas humanas. Así, las intervenciones llevadas a cabo para estimular la anterior vía, tanto eléctrica como farmacológicamente, podrían ofrecer interesantes terapias coadyuvantes al tratamiento farmacológico convencional de estas patologías

10. MICROGLÍA

La microglía constituye el sistema de defensa e inmunitario endógeno del cerebro, siendo responsable de proteger éste frente a diversos tipos de factores patógenos y/o lesivos. Las células microgliales derivan de progenitores, de origen mesodérmico/mesenquimal, que han emigrado desde la periferia. Después de invadir el SNC, los precursores microgliales se diseminan, de manera relativamente homogénea, en todo el tejido neural adquiriendo un fenotipo específico, el cual es claramente distinguible del de sus precursores, los monocitos sanguíneos.

En condiciones fisiológicas, la microglía en el SNC presenta un estado '*ramificado*' que se ha venido a denominar, de '*reposo*'. La célula microglial en reposo se caracteriza por un cuerpo celular pequeño y procesos finos y muy elaborados, los cuales envían múltiples ramas y extensiones hacia todas las direcciones. Al igual que los astrocitos, cada célula microglial tiene su propio territorio, de aproximadamente 15 a 30 μm de ancho, existiendo muy poco solapamiento entre células microgliales de territorios vecinos. Los procesos de las células microgliales en reposo están en constante y rápido movimiento a través de su territorio, siendo las estructuras que se mueven más rápido en el cerebro. Al mismo tiempo, los procesos microgliales también emiten y retraen, constantemente, pequeñas protuberancias que pueden crecer y encogerse en el orden de 2-3 $\mu\text{m}/\text{min}$. A través de todos estos movimientos, la microglía escanea aleatoriamente a través de sus dominios. Cuando se produce un daño neuronal focal, éste induce un movimiento rápido y concertado de muchos procesos microgliales hacia el sitio de la lesión y, en menos de una hora, estos últimos sitios pueden estar completamente rodeados por dichos procesos. En base a todo lo anterior se puede deducir que los procesos microgliales actúan como un sistema de escaneado muy rápido y sofisticado. Este sistema puede, en virtud de receptores que residen en el plasmalema de la célula microglial, detectar inmediatamente la agresión o lesión y, consecuentemente iniciar el proceso de respuesta activa que, eventualmente, desencadena la activación microglial.

Cuando un insulto cerebral es detectado por las células microgliales, éstas ponen en marcha una respuesta específica que se inicia con la transformación gradual de la microglía en '*reposo o ramificada*' en una forma ameboide. Este proceso, denominado "*activación microglial*", discurre a lo largo de varias etapas. Durante una primera etapa, la microglía en reposo adquiere el fenotipo M1 a través de la retracción de sus procesos, los

cuales se vuelven menos numerosos y mucho más gruesos. Paralelamente, se incrementa el tamaño de los cuerpos celulares, se modifica la expresión de enzimas y receptores y comienzan a producirse moléculas de respuesta inmune (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12) (Mosser y Edwards 2008; Mogensen 2009). Algunas células microgliales regresan a un modo proliferativo, por lo que el número de células microgliales alrededor del sitio de la lesión comienza a multiplicarse. Las células microgliales se vuelven móviles y, utilizando movimientos de tipo ameboide, se agolpan alrededor del sitio donde se ha producido el insulto. En una etapa posterior, si el daño persiste y las células del SNC comienzan a morir, las células microgliales sufren una mayor transformación y se convierten en fagocitos (fenotipo M2). Con este fenotipo, la microglía libera citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10). Esto es, naturalmente, una explicación incompleta de los cambios complejos y altamente coordinados que ocurren en las células microgliales. El proceso de activación es gradual y, lo más probable, es que existen muchos sub-estados en el camino desde el reposo hasta que la microglía adquiere su capacidad fagocítica (Benoit y col. 2008; Cherry y col. 2014). Además, las células microgliales activadas pueden mostrar propiedades bastante heterogéneas en diferentes tipos de patologías y en diferentes partes del cerebro.

La naturaleza precisa de la señal inicial que desencadena el proceso de activación microglial no está completamente dilucidada. Puede estar asociada tanto con la desaparición de algunas moléculas liberadas durante la actividad normal del SNC (*‘señal de apagado’*), como con la aparición de moléculas anómalas o concentraciones anormales de otras moléculas fisiológicamente presentes (*‘señal de encendido’*). Ambos tipos de señales pueden proporcionar a la microglía información relevante sobre el estado del parénquima cerebral dentro de su dominio territorial.

Las «señales de apagado» que pueden indicar a la microglía el deterioro en las redes neuronales no están todavía completamente caracterizadas. Un buen ejemplo para este tipo de señales son los neurotransmisores. Las células microgliales expresan una variedad de receptores para los neurotransmisores clásicos, tales como receptores para GABA, glutamato, dopamina, noradrenalina. En la mayoría de los casos, la activación de estos receptores contrarresta la activación de las células microgliales con respecto a la adquisición de un fenotipo proinflamatorio. De hecho, estas "señales de apagado" permiten que la microglía detecte la perturbación, incluso antes de que sea identificada la naturaleza del agente lesivo. En los últimos años se ha podido constatar la presencia de

$\alpha 7$ -nAChR en microglía de ratón (De Simone y col. 2005; Shytle y col. 2004). También se ha demostrado que la estimulación de este último subtipo de receptor conduce a la activación de la vía de JAK2/STAT3 promoviendo la transformación de la microglía hacia el fenotipo M2. Además, dicho receptor activa a PI3K/Akt, la cual, desencadena la ruta Nrf2/HO-1 que promueve un papel antioxidante y antiinflamatorio de la microglía (Egea y col. 2015). Hasta el momento solo un trabajo ha caracterizado la expresión del resto de subunidades nicotínicas (Rock y col. 2008). En dicho estudio observaron la expresión de ARNm de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ y $\beta 4$ en células de microglía humana.

La "señalización de encendido" es llevada a cabo por un amplio abanico de moléculas, tanto asociadas a daño celular como relacionadas con el agente extraño que invade el cerebro. Concretamente, las neuronas dañadas pueden liberar altas cantidades de ATP, citoquinas, neuropéptidos o factores de crecimiento. Muchos de estos productos pueden ser detectados por la microglía y, por tanto, inducir su activación. Por otra parte, algunas de las anteriores moléculas pueden ejecutar tanto señales de "apagado" como de "encendido". Este es el caso del ATP que, a bajas concentraciones es indicativo de una actividad sináptica normal, mientras que a altas concentraciones indica daño celular. La microglía también es capaz de detectar alteraciones en el metabolismo cerebral; así, la acumulación de amoníaco en cerebro producido durante la encefalopatía hepática puede activar células microgliales ya sea directamente o a través de compuestos intermedios, tales como NO o ATP.

11. DEPRESIÓN MAYOR

La depresión se define como un trastorno afectivo que se caracteriza por la presencia de sentimientos de tristeza, a menudo acompañada de ansiedad, pérdida de interés o de extraer placer, sentimientos de culpa, falta de autoestima, trastornos del sueño y del apetito, sensación de cansancio y falta de concentración (Fig. 21). Según las directrices establecidas por el DSM-IV (acrónimo del inglés *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition 2000*), el diagnóstico de depresión requiere de la presencia durante más de dos semanas de, al menos, 5 o más síntomas de los que se citan a continuación:

- Insomnio o hipersomnia
- Cambios en el peso o apetito
- Cambios psicomotores
- Humor irritable
- Sentimientos de inutilidad o culpa
- Anhedonia
- Fatiga o falta de energía
- Pensamientos o acciones suicidas



Figura 21: Representación pictórica de la depresión y esquizofrenia. A la izquierda, el cuadro “En el umbral de la eternidad” del pintor neerlandés Vincent Van Gogh. A la derecha, el cuadro “El grito” del pintor noruego Edvard Munch.

Esta enfermedad puede llegar a ser incapacitante. La gravedad de la misma oscila desde un cuadro leve hasta depresión grave, llegando a poder hacerse crónica o recurrente, lo cual puede dificultar el desempeño de las actividades normales laborales y sociales que se afrontan en la vida diaria. En su forma más grave, algunos enfermos depresivos ($\approx 15\%$) pueden llegar al suicidio.

11. 1 Epidemiología y clasificación

La depresión es una enfermedad que presenta alta incidencia a nivel mundial. Se estima que afecta entre un 4,3 a un 26,4 % de la población mundial, según datos epidemiológicos de la OMS recabados en 14 países de América, Europa, Oriente medio, África y Asia. Así, unos 300 millones de personas han sufrido un cuadro depresivo alguna vez en su vida. De todos ellos, solo un 10 % y un 30 %, según los países, son diagnosticados y tratados convenientemente. Cada año se suicidan por depresión cerca de 800.000 personas, siendo la segunda causa de muerte en el grupo de jóvenes de entre 15 y 29 años. La OMS prevé que, en el año 2030, la depresión unipolar será la causa con mayor carga de morbilidad a nivel mundial (Murray y Lopez 1996; Hyman 2008). La enfermedad hace su aparición en cualquier época de la vida, siendo más frecuente entre los 18 y 44 años de edad (Zisook y col. 2007), con una media de inicio sobre los 27 años. Los estudios epidemiológicos ponen de manifiesto que la incidencia, prevalencia y riesgo de depresión es dos veces superior en mujeres que en los hombres (Kuehner 2003; Bouma y col. 2008) (Fig. 22).

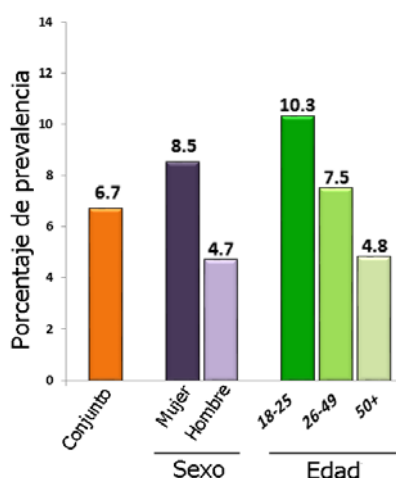


Figura 22: Porcentaje de prevalencia de depresión por sexo y grupos de edad en EE.UU en el año 2015. Adaptado de (*National Institute Mental Health*).

Los trastornos depresivos son muy heterogéneos y han sido clasificados de diversas maneras. Según el origen de la depresión, se denomina depresión reactiva a aquella detonada por acontecimientos vitales, como la muerte de un ser querido, un desengaño amoroso, el desempleo; y depresión endógena a la depresión causada por cambios fisiológicos en el cerebro, sin que el ambiente juegue un papel relevante.

Sin embargo, atendiendo a criterios neurobiológicos y farmacológicos, este trastorno afectivo se clasifica en dos grandes grupos:

- Depresión unipolar: caracterizada por la aparición de cuadros depresivos. Es de más frecuente aparición y no parece relacionarse con el historial familiar. Este tipo de depresión suele aparecer después de los 25 años y se asocia a sujetos con un componente neurótico.
- Depresión bipolar o maniaco-depresiva: aparecen alternados episodios depresivos y maníacos separados por periodos en los que la enfermedad parece remitir. Los episodios maníacos cursan con entusiasmo exacerbado, rapidez de pensamiento y lenguaje (fuga de ideas, agitación psicomotor, conducta agresiva e insomnio). Este tipo de depresión parece tener un alto componente hereditario, aunque los genes implicados aún no están bien identificados. Su aparición se produce en edades más tempranas que la depresión unipolar, y lo hace de forma abrupta.

11.2 Bases etiopatogénicas: teorías propuestas

La depresión es el resultado de interacciones complejas entre factores sociales, psicológicos y neurobiológicos. Aquellos que han pasado por circunstancias vitales adversas (desempleo, luto, traumatismos psicológicos), tienen más probabilidades de sufrir una depresión. A su vez, el estrés generado por la depresión puede empeorar la situación vital de la persona afectada y, consecuentemente, potenciar la propia enfermedad (Fig. 23).



Figura 23: Ciclo vicioso de la depresión.

Los pensamientos negativos que aparecen tras una situación de estrés, o una pérdida, ocasionan cambios hormonales y neuroquímicos que, a su vez, provocan nuevos y más intensos pensamientos negativos cerrando un círculo vicioso.

A pesar de ello, no todas las personas se deprimen ante una misma situación adversa, por lo que debe haber una mayor susceptibilidad y/o predisposición genética que hace que unos individuos sean más vulnerables que otros frente a las mismas situaciones estresantes (Caspi y col. 2003; Risch y col. 2009) (Fig. 24). Gracias a los estudios realizados en grupos familiares con miembros afectados de depresión, se ha podido conocer cuál es la prevalencia de depresión en estos grupos, respecto a la población general. Los hallazgos obtenidos muestran que, en la depresión bipolar, la prevalencia está significativamente aumentada en familiares de primer grado (padres y hermanos) del sujeto depresivo. Entre los genes que se han implicado en la etiología de la depresión se encuentra el gen *SLC6A4* el cual codifica para el transportador de 5-HT; este gen ha sido propuesto, en la actualidad, como una diana terapéutica para los antidepresivos. El gen *SLC6A4* presenta un polimorfismo con dos variantes alélicas, S (corta) y L (larga). El alelo S se asocia con una menor expresión de transportadores de 5-HT en la membrana neuronal. Otro gen que ha sido implicado en la etiología de la depresión bipolar es el gen Piccolo (PCLO), el cual puede presentar SNP, denominado rs2522833 (Sullivan y col. 2009). A través de estudios de ligamiento génico, se han implicado en la etiología de la depresión regiones cromosómicas 11pter-p15 conteniendo el gen de tirosina hidroxilasa (Camp y col. 2005), la región 2q33.34 donde se encuentra el gen que codifica para el factor de transcripción CREB (Nurnberger y col. 2001), así como ciertos polimorfismos presentes en el gen que codifica para la citoquina pro-inflamatoria $TNF\alpha$ (Jun y col. 2003a; Jun y col. 2003b).

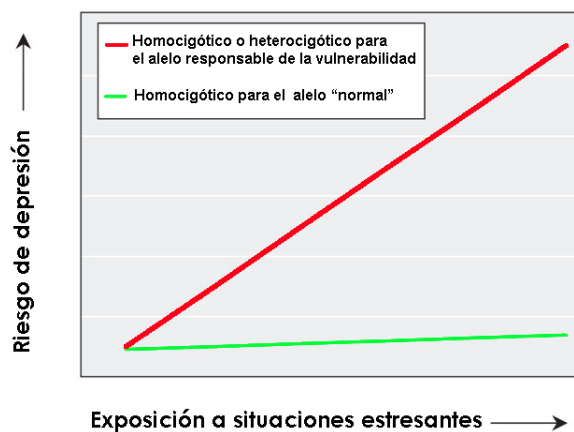


Figura 24: Influencia de genes y situaciones estresantes en la aparición de depresión. Polimorfismos genéticos pueden condicionar el riesgo de sufrir depresión ante ciertos factores adversos proporcionando una vulnerabilidad superior. Adaptado de (Mathew y col. 2009).

Los datos obtenidos de pacientes depresivos y los procedentes de modelos animales, han permitido proponer diferentes teorías para explicar la aparición de depresión. A continuación mencionaremos alguna de ellas:

a) Teoría monoaminérgica

En la década de los 60, Joseph Schildkraut propuso que una alteración de la neurotransmisión monoaminérgica debería subyacer en la etiología de la depresión (Schildkraut 1995). La afectación del sistema monoaminérgico consistiría en un déficit de 5-HT, NA y DA en las sinapsis de áreas específicas del cerebro. Esta teoría surgió a raíz del mecanismo de acción de fármacos antidepresivos como los tricíclicos (imipramina) y los inhibidores de la mono-aminooxidasa (IMAO), los cuales basaban su mecanismo de acción en un aumento de los niveles de NA y de 5-HT a nivel cerebral y periférico. Simultáneamente, se descubrió que el fármaco hipertensivo reserpina producía depresión como consecuencia de su efecto sobre las vesículas sinápticas de las neuronas monoaminérgicas, a las cuales, depletaba de su contenido en monoaminas (Goodwin y Bunney 1971). Más recientemente, estudios de imágenes con PET revelan que los pacientes depresivos presentan un incremento de expresión de MAO-A en la corteza prefrontal, corteza temporal, hipocampo, tálamo, núcleo accumbens (NAc) y mesencéfalo (Meyer y col. 2006). Este último hallazgo sugiere que un aumento en la tasa de degradación de 5-HT y NA también puede contribuir a la etiología de la depresión al disminuir la transmisión monoaminérgica (Meyer y col. 2006). Diferentes estudios también han detectado niveles bajos de metabolitos procedentes de la degradación de DA, NA y 5-HT en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes depresivos, indicando que la reducción de los 3 neurotransmisores debe subyacer en la etiopatogenia de la enfermedad (Cleare 2004).

Existen evidencias que indican que la hipótesis monoaminérgica no puede explicar, por sí misma, el origen de la enfermedad. Así, en estudios en los que produjo una depleción cerebral de triptófano, no se observaron cambios en el humor de sujetos sanos y sólo el 50 % de los individuos con historia previa de depresión experimentaron algunos síntomas (Delgado y col. 1999). Otro hecho incontrovertible es que los antidepresivos producen su efecto bioquímico (incremento neurotransmisión monoaminérgica) de forma inmediata, mientras que los efectos sobre el humor y estado de ánimo tardan en aparecer de 3- 4 semanas después de iniciado el tratamiento.

Finalmente, también se constata que fármacos como cocaína o anfetamina, que aumentan los niveles de monoaminas cerebrales no son fármacos antidepresivos. De todo lo anterior se deduce que deben existir otros mecanismos adicionales para explicar las bases etiopatogénicas de la enfermedad y el mecanismo de acción antidepresivos de los fármacos. En base a todo lo anterior, surgió una nueva teoría neurogénica de la depresión, para complementar a la anterior (Pittenger y Duman 2008).

b) Teoría neurogénica

La neuroplasticidad es definida como la capacidad del cerebro para reorganizarse a sí mismo, a través de la formación de nuevas conexiones a lo largo de su vida. La depresión podría ser el resultado de una incapacidad, por parte del cerebro, para adaptarse a factores ambientales adversos, debido a un fallo de los mecanismos normales de neuroplasticidad (Zuo y col. 2005). Este fallo podría ser revertido si se produjera un incremento de factores neurotróficos por acción de los fármacos antidepresivos. Uno de estos factores neurotróficos sería el BDNF (acrónimo del inglés, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) el cual se expresa ampliamente en las estructuras límbicas (Boldrini y col. 2009; Boldrini y col. 2012). Varias observaciones apoyan la anterior teoría neurogénica como base de aparición de depresión. Así, en pacientes con depresión mayor, se ha encontrado una disminución del volumen del hipocampo (Norrholm y Ouimet 2001) y atrofia en la arborización dendrítica de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal y del hipocampo (Fig. 25) (Norrholm, Ouimet 2001; Nestler y col. 2002). Por su parte, los fármacos antidepresivos consiguen mejorar la anterior aberración dendrítica y establecer procesos de neurogénesis (Malberg y col. 2000; Santarelli y col. 2003). Estudios postmortem realizados en pacientes depresivos detectan una menor expresión del BDNF y de su receptor TrkB en hipocampo y corteza prefrontal de pacientes con respecto a individuos sanos (Castren y col. 2007; Castren y Rantamaki 2010; Thompson Ray y col. 2011). La evidencia conductual que sustenta la teoría neurogénica proviene de modelos murinos de la enfermedad. A estos animales se les somete a la prueba de natación forzada (FST del inglés, *Forced Swim Test*) que mimetiza la conducta de desesperanza y tiene gran valor predictivo en la eficacia terapéutica de los antidepresivos (Reed y col. 2008). Los resultados de esta prueba realizada en los modelos animales inyectados con BDNF en hipocampo mostraban una reducción del tiempo de

inmovilidad del animal lo que indicaba que el efecto neurotrófico ejercía efecto antidepressivo (Shirayama y col. 2002).

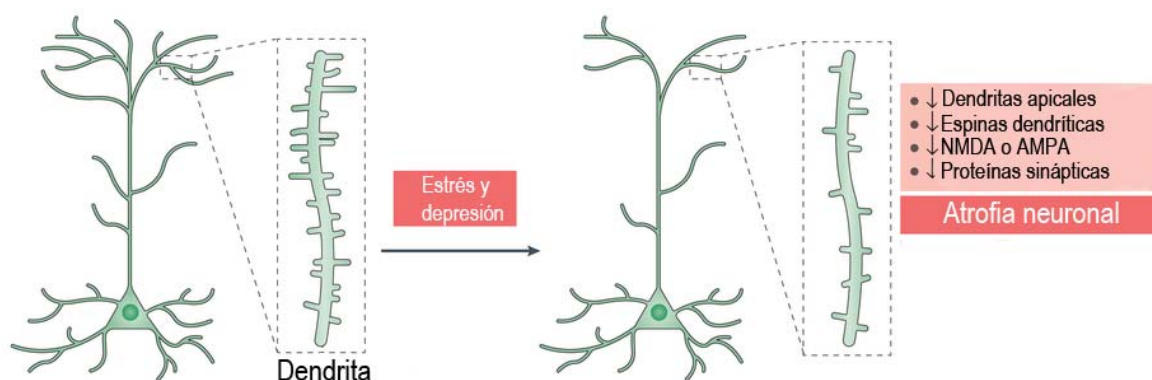


Figura 25: Daño neurotrófico presente en neuronas piramidales de corteza prefrontal e hipocampal en la depresión. En la imagen se ilustra la pérdida y disminución de la longitud de las espinas dendríticas que se acompaña de una reducción de receptores para glutamato y de otras proteínas sinápticas. Adaptado de (Wohleb y col. 2016).

Al igual que ocurría con la teoría anterior, existen algunos hallazgos contrarios a la teoría neurogénica de la depresión. Estudios postmortem de pacientes quienes sufrieron depresión, no encontraron cambios notables de morfología o signos de muerte neuronal (Muller y col. 2001).

c) Teoría de la alteración del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA)

La depresión es una patología asociada frecuentemente al estrés. Existen numerosas evidencias que muestran como los eventos estresantes de la vida, o el estrés crónico, pueden precipitar trastornos depresivos (Wise y Taylor 1990). En respuesta a una situación de estrés, se produce la liberación de la hormona hipotalámica liberadora de corticotropina (CRF) que estimula la hipófisis para que libere la hormona corticotropina (ACTH), la cual, a su vez, induce la liberación de cortisol por la corteza adrenal. CRF también es capaz de estimular el *locus coeruleus* y, consiguientemente, activar centralmente el sistema nervioso simpático. Ante situaciones de estrés crónico, se secreta cortisol de manera sostenida en el tiempo provocando hipercortisolemia, la cual bloquea la activación de los receptores de glucocorticoides en hipocampo. Dicho bloqueo impide que el control sanguíneo frene su retroalimentación negativa y, consiguientemente, se autoperpetua la hipercortisolemia. Esta hipercortisolemia crónica puede producir secuelas negativas en el individuo, ya que da lugar a un aumento de la presión arterial, supresión

inmunológica, osteoporosis (Hansen-Grant 1998), y a la vez que ha sido asociada a procesos de neurotoxicidad y disminución de la neurogénesis en hipocampo. Adicionalmente, la hipercortisolemia modifica la funcionalidad de la transmisión noradrenérgica, con la consiguiente repercusión negativa en la patología depresiva (Duval y col. 2006). Otra monoamina afectada por estrés crónico es la 5-HT, se ha observado una disminución, tanto en su liberación como de la tasa de síntesis/degradación asociada a la enzima triptófano dioxigenasa (Myint y col. 2007). También se ha encontrado una disminución en la concentración sérica de triptófano como resultado de la hipercortisolemia.

El eje HPA juega un papel muy importante en la comunicación del sistema nervioso, con los sistemas endocrino e inmune. La producción excesiva de glucocorticoides, en respuesta al estrés crónico, induce la activación de macrófagos, tanto a nivel periférico como central, aumentando la secreción de los mediadores inflamatorios desde estas células (Nguyen y col. 2000). A su vez, las citoquinas proinflamatorias son capaces de interferir con funciones monoaminérgicas centrales por una lado, y activar el eje HPA por otro.

d) Teoría colinérgica / adrenérgica

La depresión viene acompañada de síntomas característicos del déficit cognitivo, como serían la falta de atención y concentración, pérdida de memoria e incapacidad para procesar información. En todos los anteriores procesos, se ve implicada la ACh (Deutsch 1971) y el sistema colinérgico. Proyecciones colinérgicas procedentes de los núcleos basales modulan la función de numerosas áreas cerebrales implicadas en la depresión; por ello, la conservación de un tono colinérgico óptimo es básica para una correcta función cerebral (Roland y col. 2008; Dągyle y col. 2011) (Fig. 26). En base a lo anterior, se ha propuesto que una disfunción de este sistema de neurotransmisión pueda participar en la etiopatogenia de la depresión.

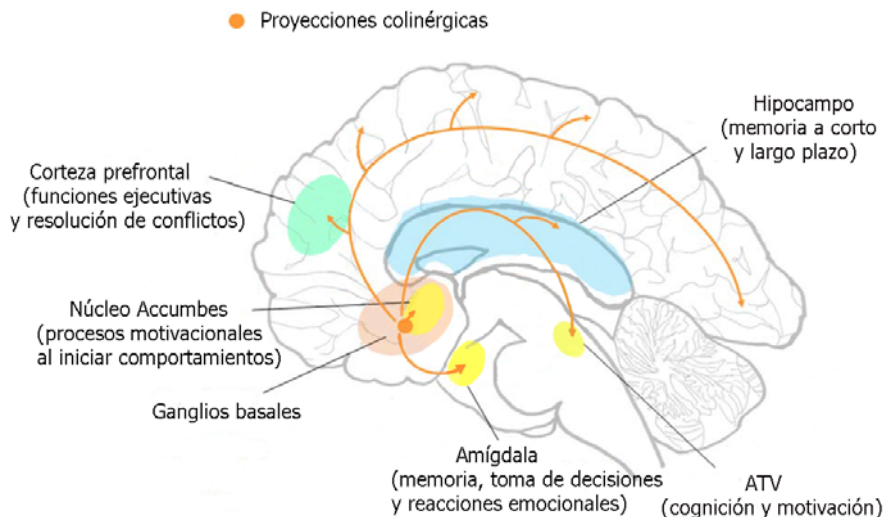


Figura 26: Áreas cerebrales que reciben proyecciones de neuronas colinérgicas de los núcleos basales. La figura ilustra las diferentes funciones controladas por las neuronas colinérgicas que inervan cada área. ATV= área tegmental ventral. Adaptado de (Holgate y Bartlett 2015).

En 1972 se postuló la teoría colinérgica/adrenérgica y su contribución en las bases etiopatogénicas de la depresión. Esta teoría se basa en el desequilibrio entre estos dos sistemas de neurotransmisores, y propugna que en la depresión hay una hiperactividad colinérgica mientras que en la manía debe existir una hiperactividad adrenérgica (Janowsky y col. 1972; Janowsky y col. 1974). Las evidencias que sostienen esta teoría son las siguientes:

1. El incremento de ACh producido por los inhibidores no específicos de acetilcolinesterasa (AChE) induce síntomas depresivos, ansiedad e irritabilidad en personas sanas (Gershon y Shaw 1961). Agricultores intoxicados con insecticidas en cuya composición figuraba la fisostagmina (inhibidor de AChE), presentaron síntomas de depresión. En pacientes ya deprimidos, los anteriores fármacos exacerbaban estos síntomas (Janowsky y col. 1974; Janowsky y col. 1983). En ratones sometidos a estrés, se observó en hipocampo una disminución de la actividad de la AChE, la cual se acompañaba de fallos en el aprendizaje y déficits de memoria (Sunanda y col. 2000; Das y col. 2000)
2. Pacientes depresivos presentan concentraciones aumentadas de colina (Charles y col. 1994; Steingard y col. 2000). En estudios cerebrales postmortem de pacientes suicidados, se ha encontrado una elevación del número de receptores muscarínicos (Meyerson y col. 1982).

3. Los fármacos antagonistas de los nAChRs producen efectos antidepresivos. Así, la escopolamina redujo los síntomas en pacientes depresivos (Drevets y Furey 2010; Fure y col. 2010), mientras que no produjo ningún efecto en ratones knockout para $\alpha 4$ y $\beta 2$ (Rabenstein y col. 2006; Mineur y col. 2007). Todos estos datos sugieren un papel relevante de los estos nAChRs en el efecto antidepresivo del anterior fármaco.
4. La administración crónica de agonistas del nAChR, como la nicotina, en fumadores produce la desensibilización de estos receptores lo que equivale a un antagonismo funcional. Esta acción de la nicotina limita la disponibilidad de nAChRs capaces de ser activados por el neurotransmisor (Picciotto y col. 2008). Existe una relación, más o menos establecida, entre el tabaquismo y la depresión. La prevalencia de fumadores en pacientes con depresión ronda el 50 % - 60 % comparada con el 25 % en la población general. Además, se ha demostrado que los parches de nicotina pueden reducir los síntomas depresivos, sugiriendo que el bloqueo de nAChRs puede ser una diana terapéutica en la depresión (Picciotto 2010). Del mismo modo, la administración crónica de nicotina tiene efectos antidepresivos en modelos animales de indefensión aprendida y natación forzada (Picciotto y col. 2008) (Tabla 1).

Tabla 1: Efectos de fármacos agonistas del nAChR en modelos animales

Tratamiento	Observaciones	Interpretación	Referencias
Agonista $\alpha 7$	Disminuye la inmovilidad en ratones	Antidepresivo	Andreasen y col. 2012
Nicotina	Disminuye la anhedonia en ratas sometidas a estrés crónico	Antidepresivo	Andreasen y col. 2011
Nicotina	Aumenta los efectos del ISRS citalopram en ratones	Antidepresivo	Andreasen y col. 2009b
Interrupción del tratamiento crónico con nicotina	Aumento de inmovilidad en ratones	Pro-depresivo	Mineur y col. 2007; Andreasen y col. 2009b

ISRS = Inhibidor Selectivo de Recaptación de Serotonina

Adaptado de (van Enkhuizen y col. 2015).

5. El estrés altera el funcionamiento del sistema colinérgico. La respuesta al estrés induce la liberación de ACh desde los ganglios basales y activa la ruta septohipocampal que media la respuesta fisiológica y emocional. El estrés crónico

provoca un declive gradual de la función colinérgica mediado por la disminución de la actividad de la AChE en hipocampo incrementando los niveles cerebrales de ACh (Dagyte y col. 2011) (Fig. 27).

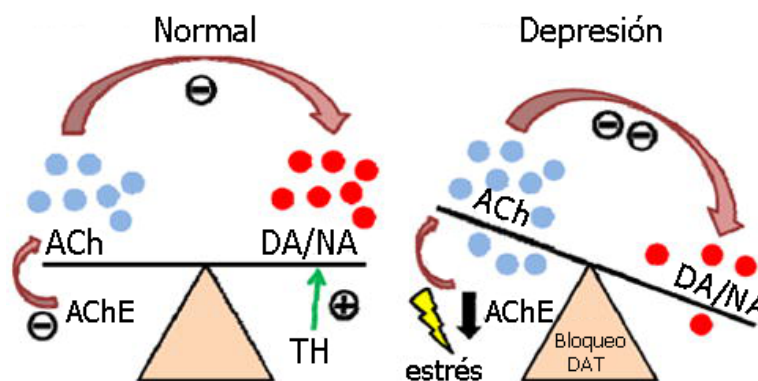


Figura 27: Desregulación colinérgica en la depresión. En individuos sanos, la AChE regula los niveles de ACh sinápticos que se encuentran en equilibrio con los niveles de DA/NA. El estrés reduce la actividad de la AChE y, consecuentemente, se produce un incremento de ACh. Adaptado de (van Enkhuizen y col. 2015).

Adicionalmente, el sistema colinérgico podría explicar otros eventos relacionados con la sintomatología de la depresión. Los pacientes depresivos muestran alteraciones en diversos ritmos circadianos, como los relacionados con algunas hormonas, el sueño o la temperatura corporal (Turek 2007; Lam 2008). El área cerebral responsable de estos ritmos es el núcleo supraquiasmático situado en el hipotálamo anterior. Este núcleo recibe proyecciones colinérgicas de los núcleos basales (Bina y col. 1993; Tuma y col. 2005) las cuales, en caso de disfunción, producirían las anteriores alteraciones que acompañan a la depresión.

Entre los integrantes del sistema de neurotransmisión colinérgica figuran los nAChRs, los cuales están extensamente distribuidos en distintas zonas cerebrales asociadas a la depresión, como el ATV, *locus coeruleus* y el núcleo dorsal del rafe. La activación del subtipo $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, expresado en estas áreas, modula la liberación de muchos neurotransmisores (Gotti 2006; Albuquerque 2009; Philip y col. 2010). Los nAChRs también ejercen efectos a nivel neuroendocrino al localizarse algunos de ellos a nivel presináptico en neuronas que liberan CRF (Okuda y col. 1993). El fármaco mecamilamina, utilizado como antihipertensivo, bloquea la liberación de CRF desde el hipotálamo (Raber y col. 1995) y, por tanto, frena la liberación de CRF.

corticosterona. La nicotina también afecta a la actividad del eje HPA, ya que, como componente del tabaco, incrementa de forma aguda el cortisol detectado en saliva (Kudielka y col. 2009). En base a todo lo anterior, algunos autores han estudiado el efecto antidepresivo de los agonistas del nAChR. El agonista selectivo de $\alpha 7$ nAChR, PNU 282987, en combinación con fármacos inhibidores de recaptación de 5-HT (ISRS), ha mostrado efectos antidepresivos en ratones sometidos a la FST y al test de suspensión por la cola (Andreasen y col. 2012; Andreasen y col. 2013). Asimismo, la mecamilamina también ha mostrado efectos positivos en niños con síndrome depresivo (Shytle y col. 2002b) y en adolescentes con el síndrome de Tourette.

e) Teoría inflamatoria

Dada la comunicación recíproca entre el SNC y el sistema inmune, cada vez han ido apareciendo más datos que apoyan la implicación de este último sistema en la etiopatogenia de las enfermedades psiquiátricas. La teoría inflamatoria de la depresión fue propuesta, por Maes en 1999 (Maes 1999). Esta teoría se basa en las siguientes observaciones:

1. Los pacientes depresivos presentan niveles séricos elevados de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF α) y una función inmune alterada (Irwin y Gillin 1987; Maes 1995; Maes 1999; Nunes y col. 2002; Yoshimura y col. 2009; Miller y col. 2009a; Miller y col. 2013). Los anteriores hallazgos han sido corroborados en varios meta-análisis (Zorrilla y col. 2001; Dowlati y col. 2010). También se ha encontrado un aumento de moléculas de adhesión celular como sICAM-1 (molécula de adhesión intracelular 1) y E-selectina (Turan y col. 2014). Más aún, se ha podido establecer una correlación significativa entre la concentración sérica de las anteriores citoquinas proinflamatorias y la gravedad de los síntomas depresivos (alteraciones del sueño, disfunción cognitiva y fatiga (Bower y col. 2002; Motivala y col. 2005). Más aún, el incremento de moléculas inflamatorias remite a niveles basales tras el tratamiento con antidepresivos (Miller y col. 2009a).
2. Se ha encontrado comorbilidad entre ciertas enfermedades inflamatorias o del sistema inmune [artritis (Ryan y McGuire 2016), esclerosis múltiple (Hoang y col. 2016), y psoriasis (McDonough y col. 2014)].

3. La administración de algunas citoquinas para tratar otras patologías desencadena depresión (Musselman y col. 2001; Raison y col. 2005b). Este es el caso del IFN α , utilizado en el tratamiento de melanoma y en hepatitis C. esta citoquina es capaz de inducir depresión en un 30 % - 50 % de pacientes que la reciben (Anisman 2011). Hay que indicar que estos síntomas depresivos remiten con tratamientos antidepresivos (Raison y col. 2005a).
4. La administración de citoquinas en animales provoca un estado denominado “*Sickness behaviour*”. Dicho estado es comparable a la depresión humana, ya que se manifiesta como anhedonia, fatiga, ingesta reducida de alimentos y alteraciones cognitivas (Anders y col. 2013). En voluntarios sanos, la inyección de una dosis baja de lipopolisacárido (LPS) produjo fiebre, anorexia, ansiedad, estado depresivo y fallos cognitivos (Reichenberg y col. 2002; Konsman y col. 2008). Este último hallazgo junto a la existencia de una predisposición genética hereditaria, ha llevado a plantear que en el desarrollo de la depresión estaría implicado un mecanismo de defensa frente a un proceso infeccioso (Anexo 1).

Se ha propuesto que las citoquinas pueden jugar un papel relevante en la etiopatogenia de la depresión al interferir con el metabolismo de los neurotransmisores, la función neuroendocrina y la plasticidad neuronal (Meyers y col. 2005; Raison y col. 2006).

Estas moléculas son glucoproteínas o proteínas de alto peso molecular que, difícilmente, podrían atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) para alcanzar concentraciones relevantes en cerebro. Sin embargo, niveles cerebrales altos de citoquinas han sido detectados en humanos en determinadas situaciones patológicas (Kim y Won 2017). Por tanto, se han propuesto una serie de vías por las que las citoquinas podrían acceder al cerebro: 1) atravesando zonas de la BHE más permeables, como los órganos circunventriculares; 2) por transporte activo; 3) a través de la vasculatura cerebral cuya permeabilidad puede verse incrementada por los macrófagos perivasculares activados; y 4) mediante la información recibida por fibras periféricas aferentes.

Una vez en cerebro, las citoquinas van a interferir con el metabolismo de los neurotransmisores 5-HT, NA y DA. En relación con el primer neurotransmisor su síntesis está limitada por la enzima indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO), la cual se encarga de transformar el aminoácido tritófano, precursor de 5-HT, en kinurenina (KYN), de esta forma, limita la cantidad final del neurotransmisor sintetizado (Dantzer y col. 2008;

Schwarcz y Pellicciari 2002). Las citoquinas, a través de las rutas de señalización inflamatorias de STAT1a, NF-kB y p38 (MAPK), activarían a IDO y, consecuentemente reducirían los niveles cerebrales de 5-HT (Fig. 28). Por otra parte, la KYN es metabolizada a ácido quinurénico (KA) en astrocitos y a ácido quinolínico (QUIN) en la microglía. Mientras el primer producto metabólico inhibiría la liberación de DA (Borland y Michael 2004), el segundo promovería la liberación de glutamato a través de la activación de receptores NMDA y, consecuentemente, produciría efectos neurotóxicos (Wu y col. 2007). Se ha demostrado que los pacientes depresivos con intento de suicidio poseen niveles cerebrales elevados de la enzima IDO y del metabolito KYN (Sublette y col. 2011). Estudios posteriores, han encontrado una correlación positiva entre los anteriores productos metabólicos del triptófano y la reducción del volumen de la amígdala y el hipocampo (Savitz y col. 2015). La síntesis de DA y NA se ve afectada por la interacción de las citoquinas con el cofactor BH₄, el cual, es necesario para el funcionamiento correcto de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima clave en la biosíntesis de monoaminas (Kitagami y col. 2003).

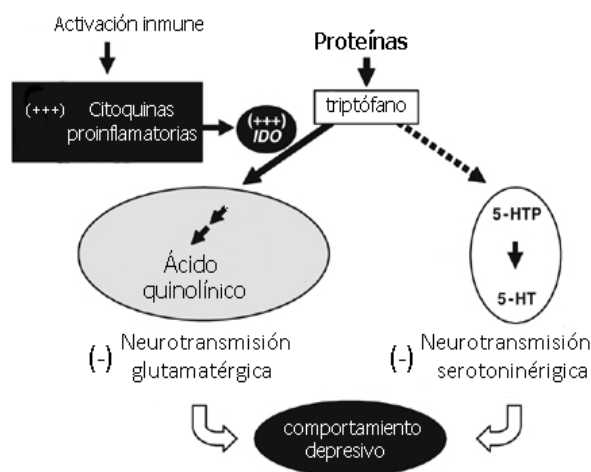


Figura 28: Alteración de la ruta metabólica de la serotonina. Los mediadores inflamatorios activan la enzima IDO, por lo que se reducen los niveles cerebrales de triptófano, precursor de la biosíntesis de 5-HT. Adaptado de (Godbout y col. 2007).

Además de las anteriores vías de acceso de citoquinas desde la periferia hasta el cerebro, el propio cerebro es capaz de sintetizar estas moléculas, fundamentalmente en la microglía, en respuesta a estímulos lesivos. Ante una situación de estrés crónico generada por la depresión, la NA liberada, a través de receptores α y β -adrenérgicos, activa la microglía y la transforma a en su fenotipo M1 con la consiguiente producción de citoquinas proinflamatorias y liberación de especies reactivas de oxígeno (Grisanti y col.

2011; Wohleb y col. 2011). Sin embargo, si la respuesta inflamatoria es excesiva o persiste en el tiempo, este mecanismo defensivo se vuelve lesivo para la propia depresión al producir una reducción de los neurotransmisores al interferir con su síntesis. En base a lo anterior, se ha propuesto que la microglía pueda ser una diana terapéutica putativa en el tratamiento de la depresión. Dado el efecto antiinflamatorio del $\alpha 7$ -nAChR expresado en los macrófagos periféricos, la presencia de este subtipo de receptor en microglía, podría conducir al estudio de la actividad antidepressiva de fármacos agonistas de $\alpha 7$ -nAChR (Fig. 29).

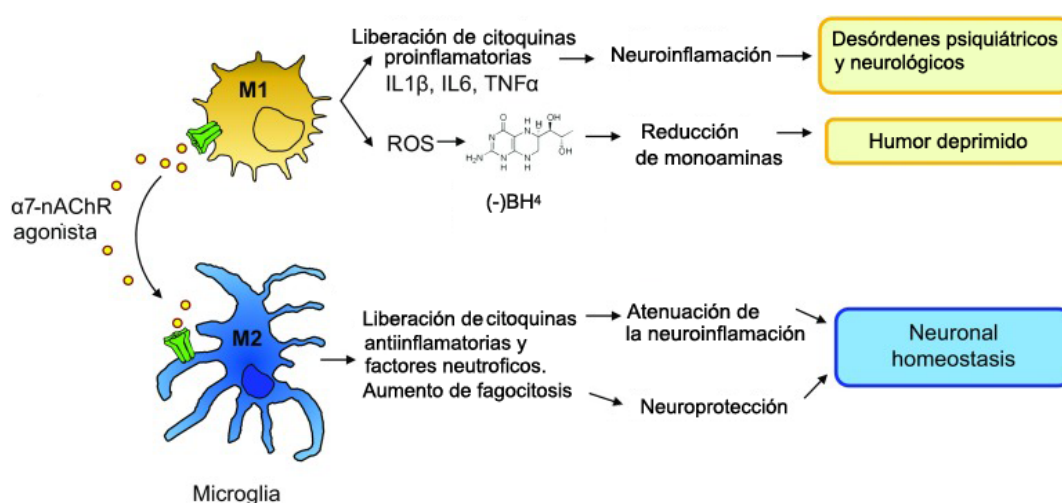


Figura 29: Papel de la microglía en la etiopatogenia de la depresión. Ante una posible agresión (infección, virus, estrés...), la microglía es activada a su fenotipo M1 para responder al efecto lesivo. Una persistencia de la respuesta inflamatoria conduce a la alteración del sistema de neurotransmisión monoaminérgico lo cual puede favorecer la depresión. La activación de $\alpha 7$ -nAChRs promueve la polarización de la microglía hacia el fenotipo M2, con el consiguiente efecto antiinflamatorio. Así, los agonistas del $\alpha 7$ -nAChR, al disminuir la inflamación y restaurar los niveles de monoaminas podrían mejorar la sintomatología de la depresión. Adaptada de (Kalkman y Feuerbach 2016).

Hasta el momento, solo se han realizado tres estudios postmortem en los que se ha analizado el estado de la microglía en pacientes depresivos. El primer estudio observó un importante marcaje del complejo mayor de histocompatibilidad (MHCII), el cual es un marcador de la microglía activada (Bayer y col.. 1999). Mientras, el segundo trabajo halló niveles elevados de ácido quinolínico en células microgliales del cortex cingulado anterior (Steiner y col. 2011), y el tercero un incremento del marcador de neuroinflamación TSPO (traslocador mitocondrial de 18 kDa) en corteza prefrontal, ínsula, cortex cingulado anterior. El incremento de este último biomarcador se correlacionó con la gravedad de la depresión sufrida por el paciente (Setiawan y col. 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, las citoquinas también interfieren con el eje HPA, estimulando la liberación de CRF y ACTH, y por tanto, incrementando los niveles séricos de cortisol (Kim y Won 2017). La activación de vías de señalización inflamatorias, como las de NF-kB, p38MAPK y STAT-5, inhiben el receptor de glucocorticoides en hipocampo (Pace y col. 2007).

El estado inflamatorio persistente que puede acompañar a la depresión también puede afectar a la plasticidad neuronal al producir una reducción de la neurogénesis, un aumento del estrés oxidativo, neurotoxicidad por exceso de glutamato e inducción de apoptosis. Todas estas alteraciones van a afectar no solo a las neuronas, sino también a astrocitos y microglía (Kim y Won 2017).

11.3 Uso de fármacos antiinflamatorios en el tratamiento en la depresión

Diversos estudios evaluando el efecto de la inclusión de fármacos antiinflamatorios en las pautas terapéuticas convencionales de la depresión, han mostrado resultados prometedores (Muller y col. 2006; Tying y col. 2006; Akhondzadeh y col. 2009; Abbasi y col. 2012). También los resultados de dos meta-análisis recientes han demostrado efectos positivos del tratamiento antiinflamatorio en el tratamiento de pacientes depresivos (Kohler y col. 2014; Na y col. 2014). Sin embargo, existe aún debate en la literatura en relación a estos y otros resultados de signo contrario, dada la heterogeneidad metodológica empleada en todos estos estudios (Kohler y col. 2014; Eyre y col. 2014). Antiinflamatorios no esteroideos, como celecoxib (inhibidor selectivo de COX-2), han sido empleados como tratamientos coadyuvantes de los antidepresivos convencionales. Los resultados de estos últimos estudios muestran que la incorporación de celecoxib disminuía la sintomatología depresiva frente al tratamiento antidepresivo convencional (Kohler y col. 2014; Na y col. 2014). Adicionalmente, existen estudios en los que se demuestra que el antidepresivo del grupo los ISRS, fluoxetina, es capaz de producir efectos antiinflamatorios (Abdel-Salam y col. 2004; Roumestan y col. 2007; Alboni y col. 2016).

11.4 Tratamiento farmacológico de la depresión

a) Fases del tratamiento

La duración de los episodios depresivos no tratados oscila entre 6-24 meses, solo el 5 % - 10 % de estos episodios supera los 2 años de duración. El tratamiento farmacológico permite acortar la duración de los episodios, acelerando la recuperación y evitando las recaídas y recurrencias (Burcusa y Iacono 2007). De esta manera, el tratamiento de la depresión evita que ésta se cronifique.

En la fase aguda de la enfermedad, el objetivo básico del tratamiento consiste en eliminar todos los síntomas de la misma. Este objetivo no se alcanza hasta que transcurren varias semanas de tratamiento. En una segunda etapa, una vez que el paciente se recupera y no presenta sintomatología durante los 4-9 meses posteriores, se puede considerar la retirada paulatina de los fármacos o mantenerlos a dosis más bajas para evitar las recurrencias. Esta fase de mantenimiento del tratamiento puede durar desde 1 año a toda la vida, dependiendo de la probabilidad de que se produzcan recurrencias (Fig. 30). En caso de episodios depresivos refractarios al tratamiento, se recurre al cambio de fármaco antidepresivo, o a la asociación de más de un fármaco como estrategia de potenciación (Burcusa y Iacono 2007).

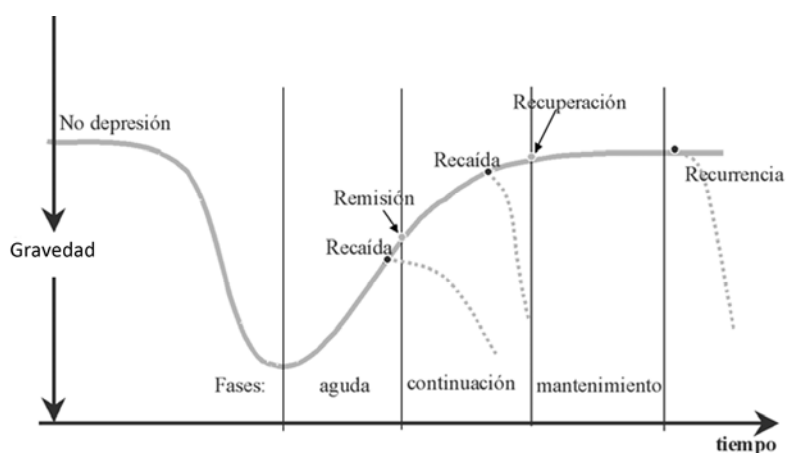


Figura 30: Representación de las fases del tratamiento antidepresivo. Tomado de Guía de Seguimiento Farmacoterapéutico sobre Depresión, 2003.

Aproximadamente, dos terceras partes de los pacientes que utilizan antidepresivos responden al tratamiento. Los primeros signos de mejoría comienzan a manifestarse después de un par de semanas de tratamiento, pero la recuperación definitiva no se inicia

hasta pasadas 3 a 6 semanas de iniciar el tratamiento. La recuperación completa suele llegar a las 6-8 semanas. La duración mínima de tratamiento debe ser de 6 meses, una vez alcanzada la estabilización del estado de ánimo del paciente, ya que el mayor riesgo de recaída se produce en los 4-6 meses posteriores al inicio del tratamiento. Un 69 % de recaídas son producidas por un adelanto de la interrupción del tratamiento. Los casos refractarios, o muy recurrentes, requieren tratamiento antidepresivo de mantenimiento (García – Delgado Morente y Gastelurrutia 2003).

b) Fármacos antidepresivos

En la actualidad, el tratamiento farmacológico de la depresión sigue recayendo, en gran medida, en los fármacos que incrementan los niveles de monoaminas cerebrales por uno u otro mecanismo (Tabla 2). Los primeros fármacos introducidos en la terapéutica de la depresión fueron los inhibidores de la monoamino-oxidasa IMAO, representados por la iproniácida (1951) y, pocos años después, los tricíclicos (ATC), con el fármaco imipramina (1957) (Frazer 1997). El mecanismo de acción de los primeros IMAOs consistía en la inhibición irreversible de la enzima MAO-A que se encarga de la degradación de las monoaminas no almacenadas en vesículas. La inhibición del enzima conduce, por tanto, al incremento de las reservas citosólicas de dichos neurotransmisores. La irreversibilidad de unión del IMAO a la enzima dificultaba el control de los efectos adversos e interacciones de estos fármacos con otros fármacos o con alimentos ricos en tiramina. Por ello, los IMAO a pesar de que hoy se disponen de derivados que se unen a la enzima reversiblemente, no son fármacos de primera elección en el tratamiento de la depresión sino que se recurre a ellos en depresiones refractarias al tratamiento con otros antidepresivos.

Los fármacos ATC bloquean, de forma inmediata, el transportador de 5-HT encargado de recuperar el neurotransmisor liberado a la hendidura sináptica por parte del terminal sináptico. El incremento de monoaminas en la hendidura sináptica producido por los ATC activa receptores específicos que conducen a elevación del AMPc y de la $[Ca^{2+}]_i$ y la consiguiente activación de quinasas (PKA, CaMK II) que terminan por fosforilar al factor de transcripción CREB que activa la expresión de diversos genes, incluido el gen que codifica para el BDNF. En general, todos los ATC, además de incrementar las monoaminas cerebrales, bloquean distintos tipos de receptores α - adrenérgicos, muscarínicos, histaminérgicos, produciendo efectos secundarios característicos del bloqueo de todos estos tipos de receptores (sequedad de boca, estreñimiento, visión

borrosa, hipotensión postural, taquicardias, arritmias, etc). Los efectos que estos fármacos ejercen sobre el transportador de monoaminas a nivel central se producen también a nivel de las neuronas simpáticas que inervan el corazón, produciéndose un incremento de la NA en estas sinapsis y, consecuentemente, taquicardias y arritmias.

Los fármacos más utilizados actualmente para tratar la depresión son los inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (ISRS) cuyo primer representante fue la fluoxetina (1987). Este grupo antidepresivo, al bloquear el transportador de serotonina selectivamente, carecen de los efectos secundarios cardiacos producidos por los ATC, aunque presentan otros propios (cefaleas, insomnio, náuseas y vómitos). Sin embargo, los ISRS no han logrado incrementar la eficacia clínica de los antidepresivos clásicos (IMAO y ATC) ni tampoco adelantar la aparición de sus efectos terapéuticos (Song y col. 1993). Nuevos fármacos antidepresivos han ido apareciendo tras los ISRS, como los de “acción dual”, que inhiben la recaptación de 5-HT y NA (IRSN) o inhibidores de la recaptación de DA y NA (IRND), pero que, a diferencia de los ATC, no bloquean otros tipos de receptores. A pesar de las expectativas generadas, estos nuevos fármacos tampoco han logrado aumentar la eficacia ni disminuir el tiempo de latencia desde el inicio del tratamiento hasta la aparición del efecto terapéutico.

Tabla 2: Clasificación de los fármacos antidepresivos según su mecanismo de acción.

Fármaco	Principio activo
IMAO	Tranilcipromina (no selectivo) / Moclobemida (selectivo de MAO A)
ATC	Imipramina, amitriptilina, desipramina, clomipramina, tianeptina
ISRS	Citalopram, fluoxetina, fluvoxamina, sertralina, paroxetina
ISRN	Reboxetina, maprotilina
duales	
IRSN	Venlafaxina, duloxetina
otros	
ASIR	Trazodona nefazodona
NASSA	Mirtazapina mianserina
ISRD	bupropión

IRSN = inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina.

ASIR = antagonista de la serotonina 2 e inhibidor de la recaptación de 5-HT.

NASSA = inhibidores noradrenérgico y serotoninérgico específico.

ISRD = inhibidor selectivo de recaptación de DA.

El desarrollo de efectos adversos junto con el retraso en la eficacia antidepressiva y la existencia de un 30 % de pacientes refractarios al tratamiento (Krishnan y Nestler 2008), han impulsado el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas a la depresión. El tiempo de latencia en aparecer el efecto antidepressivo de estos fármacos se ha relacionado con el tiempo que tarda el fármaco en restablecer la sensibilidad de los receptores, la cual estaría incrementada en la depresión (Stahl 2000) (Fig. 31).

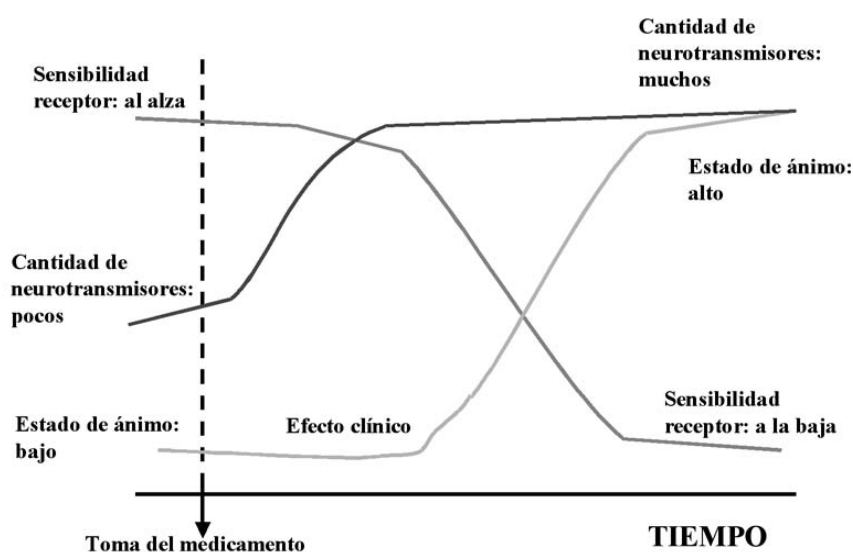


Figura 31: Efecto neurobiológico y clínico de los fármacos antidepressivos a largo plazo. Tomado de Guía de Seguimiento Farmacoterapéutico sobre Depresión, 2003.

Para las depresiones refractarias al tratamiento y, así como, para la depresión con ideas suicidas suicidas, la terapia electroconvulsiva (TEC) se ha mostrado como un tratamiento eficaz y rápido en la fase aguda de la enfermedad pero de eficacia limitada en el tiempo. Esta terapia se basa en la aplicación de una descarga eléctrica (40 s) en la cabeza con el fin de revertir los desequilibrios de neurotransmisores cerebrales (García – Delgado Morente y Gastelurrutia 2003). Como contrapartida, la descarga también genera convulsiones en el paciente. La descarga se aplica al paciente 2-3 veces por semana, hasta un máximo de 12 semanas. El paciente está bajo anestesia general y con relajantes. Finalmente, cabría resaltar que la estimulación del nervio vago, la cual reduce la inflamación periférica en animales de experimentación (Borovikova y col. 2000a; Tracey 2009) se ha mostrado eficaz para el tratamiento de la depresión refractaria a fármacos (Bajbouj y col. 2010; Howland 2014).

OBJETIVOS

El $\alpha 7$ -nAChR, expresado en neuronas y células inmunes (microglía) del SNC, regula la liberación de distintos neurotransmisores así como la producción de citoquinas proinflamatorias, respectivamente. Adicionalmente, se ha identificado un nuevo gen (*CHRFAM7A*) que codifica para la subunidad nicotínica dup $\alpha 7$. Nuestro grupo fue el primero en identificar la función del nuevo gen en un sistema de expresión heteróloga, como los ovocitos de *Xenopus*. El nuevo gen se comportaba como un modulador negativo de la actividad del $\alpha 7$ -nAChR. Sin embargo, se desconoce si dup $\alpha 7$ interacciona físicamente con el $\alpha 7$ -nAChR, así como si dicha interacción se puede producir en diversos tipos celulares de mamífero y, en caso positivo, cuál sería la consecuencia funcional de dicha interacción.

En base a todo lo anterior, el **OBJETIVO GENERAL** de este trabajo ha sido estudiar el mecanismo de interacción $\alpha 7$ /dup $\alpha 7$ así como dilucidar el papel fisiopatológico de dicha interacción a nivel de la neurotransmisión.

Para alcanzar el anterior objetivo general se han abordado los siguientes **OBJETIVOS PARCIALES**:

1. Evaluar si dup $\alpha 7$ interacciona físicamente con el $\alpha 7$ -nAChR formando un receptor mixto en líneas celulares de mamíferos de tipo neuroendocrino (GH4C1), inmune (RAW 264.7) y neuronal (SH-SY5Y).
2. Determinar el mecanismo por el que dup $\alpha 7$ reduce la actividad del $\alpha 7$ -nAChR en células RAW264.7.
3. Preparar células SH-SY5Y con sobreexpresión estable de dup $\alpha 7$.
4. Evaluar las consecuencias funcionales de la sobreexpresión de dup $\alpha 7$, en las anteriores células, a través de la medida de $[Ca^{2+}]_i$ y de secreción inducidos por la activación del $\alpha 7$ -nAChR.
5. Evaluar el nivel de expresión de los ARNms de $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ en células de sangre periférica de pacientes con depresión mayor para analizar la correlación de dicho nivel con la gravedad de la enfermedad (Escala Hamilton).
6. Evaluar si fármacos antidepresivos con diferentes mecanismos de acción, pueden ejercer su efecto terapéutico a través de la regulación de la expresión de los ARNms de $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$, así como de otras subunidades del nAChR, en células SH-SY5Y y células de microglía humana (C13NJ).

Materiales y Métodos

1. SOLUCIONES, REACTIVOS, KITS COMERCIALES Y ANTICUERPOS EMPLEADOS.

Tabla 3: Soluciones

	Uso	Composición
Solución LB (Luria Bertani Broth)	Cultivo bacterias	10 g/L triptona; 5 g/L extracto de levadura; 5 g/L NaCl
Solución PBS (del inglés, <i>phosphate buffered saline</i>)	Varios	En mM: 136 NaCl, 2 KCl, 8 Na ₂ HPO ₄ , 2 KH ₂ PO ₄ ; pH=7,4.
Solución de lisis NP- 40	Lisis proteínas	En mM: (150 NaCl, 50 Tris-HCl, 1 EDTA, 50 Na ₃ VO ₄ , 50 NaF, 50 β-glicerolfosfato), 1 % NP-40, 1 % inhibidor de proteasas; pH=8.
Solución de Electroforesis	Inmunoblot	En mM: (25 Tris base, 19 glicina), 1 % SDS.
Solución de Transferencia	Inmunoblot	En mM: (25 Tris base, 190 glicina), 20 % metanol.
Solución de carga	Inmunoblot	En mM: 100 Tris-HCl, 20 % glicerol, 4 % SDS, 0,2 % azul de bromofenol, 4 % β-mercaptoetanol pH =6,8.
Solución TBS (del inglés, <i>Tris-buffered saline</i>)	Inmunoblot	En mM: 20 Tris-HCl, 136,8 NaCl pH= 7,5.
Solución TTBS	Inmunoblot	En mM⊗ 20 Tris-HCl 20, 136,8 NaCl), 0,1 % Tween-20 pH= 7,5.
Solución HBSS (<i>Hank's balanced salt solution</i>)	Inmunocitoquímica	En mM: 137 NaCl, 5,4 KCl, 0,25 Na ₂ HPO ₄ , 0,44 KH ₂ PO ₄ , 1,3 CaCl ₂ , 1 MgSO ₄ , 4,2 NaHCO ₃ .
Solución KH (Krebs Hepes)	Medida de [Ca ²⁺] _i	En mM: 144 NaCl, 5,9 KCl, 1,2 MgCl ₂ , 10 Hepes, 11 Glucosa, 2 CaCl ₂ ; pH= 7,4.
Solución KH alto K ⁺	Inducción despolarización	En mM: 75 NaCl 75, 75 KCl, 1,2 MgCl ₂ , 10 Hepes 10, 11 Glucosa, 2 CaCl ₂ ; pH= 7,4.
Solución KH (con ácido ascórbico como antioxidante)	Medida de dopamina liberada	En mM: 144 NaCl, 5,9 KCl, 1,2 MgCl ₂ , 10 Hepes , 11 Glucosa, 2 CaCl ₂ , 0,2 C ₆ H ₈ O ₆ ; pH= 7,4.

Tabla 4: Medios y Reactivos para cultivos celulares.

Reactivos	Uso	Casa comercial
HAM-F10, DMEN-F12 y DMEN	Medios de cultivo	Gibco, Invitrogen
Suero fetal bovino (SFB) y suero de caballo (HS)	Cultivos células	Gibco, Invitrogen
Glutamax y glutamina	Cultivos células	Gibco, Invitrogen
Penicilina/estreptomicina	Cultivos células	Gibco, Invitrogen
Gentamicina	Cultivos células	Sigma
Ampicilina y Kanamicina	Cultivo bacterias	Sigma
Antibiótico G418 (neomicina)	Selección células	Sigma

Tbla 5: Reactivos de Inmunofluorescencia y Citometría.

Reactivos	Uso	Casa comercial
Wheat Germ Agglutinin Alexa Fluor 647 conjugate (WGA)	Inmunofluorescencia	Molecular Probes
DAPI	Inmunofluorescencia	Molecular Probes
Prolong Gold Antifade Reagent	Inmunofluorescencia	Molecular Probes
Poli-L-lisina	Inmunofluorescencia	Sigma
Citifluor AF-2 Antifadent Mountant Solutions	Inmunofluorescencia	VWR
α -Bgtx-Alexa488 conjugada	Citometría	Molecular Probes

Tabla 6: Reactivos y Kits de transfección.

	Uso	Casa comercial
Lipofectamina 2000	Transfección	Invitrogen
OPTIMEN	Transfección	Invitrogen
Trans IT-TKO	Transfección	Mirus Bio
Cell Line Nucleofector Kit-V	Nucleofección	Amara Biosystems (Lonza)

Tabla 7: Reactivos y Kits de Extracción de ADN de plásmido, ARN, RT, qPCR e Inmunoblot

	Uso	Casa comercial
Plasmid Midi Kit	Extracción ADN plásmido de <i>E.coli</i>	Qiagen
Rneasy Mini Kit	Extracción ARN total	Qiagen
QIAamp RNA Blood Mini Kit	Extracción ARN total	Qiagen
Taqman Reverse transcription reagent	Transcripción reversa	Applied Biosystems
iTaq Fast SYBR Green Supermix with ROX	PCR en tiempo real	Bio-Rad
BCA Protein Assay Kit	Cuantificación proteínas	Thermo Scientific (Pierce)
ECL Plus	Inmunoblot	Ge Healthcare
Marcador de peso molecular de proteínas	Inmunoblot	Thermo Scientific
Inhibidor de proteasas	Inmunoblot	Sigma
Membranas PVDF	Inmunoblot	Millipore Corporation
Películas Curix RP2 PLUS	Inmunoblot	Agfa Healthcare NV

Tabla 8: Sondas fluorescentes y otros reactivos para medir $[Ca^{2+}]_i$ y secreción.

	Uso	Casa comercial
Fluo 4-AM	$[Ca^{2+}]_i$ en poblaciones	Molecular Probes
Fura 2-AM	$[Ca^{2+}]_i$ en célula única	Molecular Probes
FM1-43	Exocitosis en célula única	Molecular Probes
Ácido plurónico	$[Ca^{2+}]_i$ en poblaciones /célula única	Molecular Probes

Tabla 9: Anticuerpos.

Anticuerpo	Uso	Dilución	Especie	Casa comercial
ANTICUERPOS PRIMARIOS				
anti- β -actina	Inmunoblot	1:1000	Cabra	Sigma
anti-myc	Inmunoblot Inmunofluorescencia Citometría	1: 200	Ratón	Roche
anti- α 7 / dup α 7 (sc-5544)	Inmunoblot	1: 500	Conejo	Santa Cruz
anti-Cherry	Inmunoblot	1: 2000	Ratón	Abcam
mab306 (anti- α 7)	Inmunofluorescencia	1: 3000	Ratón	Sigma
anti-GFP	Inmunoblot	1: 1000	Ratón	Roche
ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
anti-ratón IgG (HRP)	Inmunoblot	1: 5000	Cabra	Santa Cruz
anti-conejo IgG (HRP)	Inmunoblot	1: 4000	Cabra	BioRad
anti-cabra IgG (HRP)	Inmunoblot	1: 5000	Cabra	Santa Cruz
anti-ratón IgG (Alexa 488)	Inmunofluorescencia	1: 400	Cabra	Molecular Probes
anti-ratón IgG (Alexa 546)	Citometría	1: 600	Cabra	Molecular Probes

Tabla 10: Fármacos

	Uso	Casa comercial
PNU 282987	Agonista selectivo α 7-nAChR	Abcam
PNU 120596	MAP del α 7-nAChR	Tocris
Imipramina	ATC	Abcam
Tranilcipromina	IMAO	Tocris
Fluoxetina	ISRS	Tocris
Reboxetina	ISRN	Tocris
IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α	Citoquinas e Interferones	Peprtech

Tabla 11: Otros Reactivos

Reactivos	Uso	Casa comercial
Dopamina	Incubación celular	Sigma
Dopamine High Sensitive ELISA	Cuantificación de liberación DA	DLD Diagnostika GMBH
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Viabilidad celular	Roche
Quantikine ELISA kit	Cuantificación proteínas pacientes	R&D Systems

2. CULTIVOS CELULARES.

2.1 Línea celular GH4C1 de pituitaria de rata.

Las células GH4C1 conforman una línea celular de carácter neuroendocrino procedente de un tumor de pituitaria de rata. Estas células carecen de la expresión endógena del $\alpha 7$ -nAChR por lo que constituyen un buen modelo para analizar la expresión heteróloga de este receptor al disponer endógenamente de la chaperona RIC-3. Esta chaperona, tal como se describió en la sección de Introducción, es esencial para el correcto plegamiento y ensamblaje de subunidades $\alpha 7$ a la hora de conformar la estructura pentamérica del nAChR (Lansdell y col. 2005; Williams y col. 2005; Treinin 2008; Dau y col. 2013).

Las células obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA), fueron cultivadas en medio HAM-F10 conteniendo 15 % HS y 2,5 % SFB (ambos inactivados) junto con penicilina/estreptomicina. Las células fueron mantenidas en incubador a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de O₂, de acuerdo a las instrucciones de ATCC. Tras su descongelación, las células se mantuvieron en frascos de cultivo (T75) y, tras varios pases, se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos con poli-L-lisina para facilitar su adhesión.

2.2 Línea celular RAW 264.7 de macrófagos murinos.

Los macrófagos murinos peritoneales RAW 264.7 constituyen un modelo ideal para estudiar la inflamación, a la vez que constituyen un buen modelo célula colinérgica, de tipo no neuronal, al expresar endógenamente el $\alpha 7$ -nAChR, la colinacetiltransferasa (ChAT) y la acetilcolinesterasa (AChE) (Klapproth y col. 1997; Sharma y Vijayaraghavan 2002).

Estas células, obtenidas de ATCC, fueron cultivadas en medio DMEM, suplementado con 10 % SFB inactivado, Glutamax 1X y penicilina/estreptomicina, siendo mantenidas en incubador a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de O₂.

2.3 Línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano.

Se trata de una línea celular de neuroblastos que ha sido ampliamente utilizada en estudios de neurobiología (Kovalevich y Langford 2013). Estas células, tanto en estado no diferenciado como diferenciado a neuronas, expresan marcadores de la ruta biosintética de dopamina (TH), así como el transportador de dopamina (DAT) encargado

de la recaptación de la amina extracelular. Adicionalmente, estas células también expresan receptores de DA (D2R y D3R) (Kovalevich y Langford 2013; Arun y col. 2008), así como receptores muscarínicos y nicotínicos. Entre las subunidades nicotínicas expresadas por las células SH-SY5Y se encuentran las $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$ y $\beta 4$, careciendo de subunidades $\alpha 4$ (Gould y col. 1992; Lukas y col. 1993; Peng y col. 1994; Valor y col. 2003).

Las células se cultivaron en medio DMEM-F12 suplementado con un 10 % SFB inactivado, Glutamax 1X y penicilina/estreptomicina, en un incubador humidificado a una temperatura constante de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de O₂.

2.4 Línea celular C13NJ de microglía humana.

Las células C13NJ poseen las propiedades de adherencia, fagocíticas y actividad esterasa intracitoplasmática propias de los cultivos primarios de microglía (Janabi y col. 1995; Martin y col. 2003). Esta línea celular no expresan el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor (MHCII) pero su expresión, junto la de IL-6, puede ser inducida por la estimulación del IFN γ (Peudenier y col. 1991).

Las células fueron mantenidas en medio DMEN suplementado con 10 % SFB, 2 mM L- glutamina y 50 g/ml de gentamicina en un incubador humidificado a una temperatura constante de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de O₂.

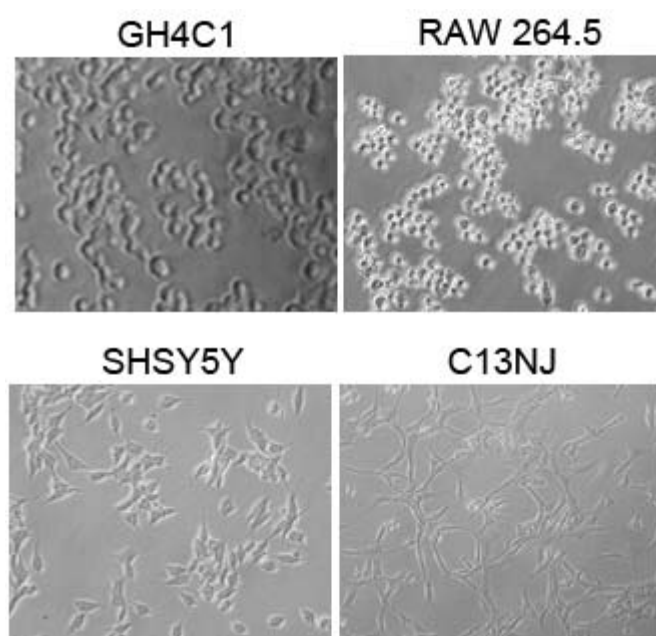


Figura 32: Imágenes de las líneas celulares utilizadas en este estudio. Las imágenes, realizadas en campo claro, fueron captadas por microscopía óptica.

3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN DEL PLÁSMIDO.

Las diferentes construcciones utilizadas en este trabajo, así como su amplificación en bacterias *Escherichi. coli*, se realizó mediante técnicas de biología molecular bien establecidas en nuestro laboratorio. Con objeto de purificar el plásmido correspondiente a las construcciones con el que transfectar células eucariotas, se procedió al crecimiento de las bacterias conteniendo el plásmido en 250 ml de medio LB (Tabla 3) con el antibiótico de selección correspondiente: ampicilina [50 mg/ml] para las bacterias portadoras de los plásmidos dup α 7.pcDNA3.1/myc-his o de su vector vacío (pcDNA3.1/myc-his), y kanamicina [50 mg/ml] para las bacterias con las construcciones conteniendo los vectores pEGFP y pmCherry-N1. El crecimiento bacteriano se desarrolló a lo largo de toda la noche en incubador a 37 °C. La extracción y purificación del ADN del plásmido se realizó con el kit comercial Plasmid Midi Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del plásmido obtenido fue determinada en un equipo NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific).

4. PROCEDIMIENTOS DE TRANSFECCIÓN

4.1 Transfección con lipofectamina

El proceso de transfección con lipofectamina 2000 se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y ácidos nucleicos, lo cual permite a estos últimos atravesar la membrana plasmática y acceder al citosol de la célula. La lipofectamina es ampliamente utilizada en los procedimientos de transfección celular debido al alto rendimiento de las moléculas transfectadas y a la baja toxicidad del reactivo (Yongliang Chu 2009).

En el presente estudio se utilizó este método para transfectar las líneas celulares GH4C1 y SH-SY5Y, de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante. Brevemente, las células fueron sembradas 24 horas antes de la transfección a la densidad adecuada, con objeto de conseguir que alcanzaran una confluencia del 70 - 80 % el día del experimento. En el caso de las células GH4C1, éstas fueron sembradas (200.000 células) en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina, los cuales fueron depositados en

placas de 24 pocillos (P-24). Por su parte, las células SH-SY5Y fueron sembradas en placas P-60, a una densidad de 800.000 células/placa. Para realizar la transfección, previamente se preparó una solución que contenía lipofectamina en medio Optimen y, por otro lado, el plásmido a transfectar disuelto en el mismo medio. Ambas soluciones se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se mezclaron e incubaron durante 20 minutos. La mezcla obtenida se añadió, “gota a gota”, sobre las células dejándose en contacto con las mismas durante 5 horas a 37 °C. Transcurrido ese periodo, se sustituyó el medio completo por otro fresco, y las células fueron mantenidas en incubador durante 48 horas antes de iniciar los experimentos.

4.2 Nucleofección

La nucleofección, implantada en 1998, se ha convertido en el método de transfección no viral más efectivo para cultivos primarios y líneas celulares consideradas difícilmente transfectables (Aluigi y col. 2006). La base de la técnica consiste en la creación de poros en la membrana celular de carácter transitorio. Los poros son creados por la aplicación de pulsos eléctricos generados por un nucleofector, así como por la utilización de productos específicos, según el tipo celular, que favorecen el paso del ácido nucleico hasta el núcleo celular (Maasho y col. 2004).

En nuestro estudio, hemos procedido a la nucleofección de células RAW 264.7 y SH-SY5Y utilizando un kit comercial de Lonza específico para estas líneas celulares. La electroporación se llevó a cabo en el Nucleofector de Lonza con el programa D-032 para las células RAW 264.7 y el programa A-023 para las células SH-SY5Y. Previamente a la aplicación del pulso eléctrico, el procedimiento se inició con la resuspensión de 2×10^6 células/reacción en 100 μ l del reactivo del kit, añadiendo a la anterior suspensión celular las diferentes construcciones utilizadas en este estudio. Finalizado el proceso, las células fueron resuspendidas en medio fresco y sembradas en placas P-100 no adherentes, manteniéndolas en cultivo hasta el momento de realizar el experimento.

4.3 Silenciamiento génico con siRNA

La interferencia post-transcripcional del ARNm es una herramienta muy utilizada actualmente en investigación biológica para estudiar el efecto del bloqueo de la expresión de un determinado gen. El ARN de interferencia (siRNA, del inglés *small interfering RNA*) es un ARN de cadena sencilla que se genera por la rotura de un ARN pequeño (\approx

20 nucleótidos) de doble cadena. La rotura es producida por la acción de una endorribonucleasa endógena incluida en el complejo denominado RISC (RNA-induced silencing complex) (Hamilton y Baulcombe 1999). La monocadena generada es complementaria al ARNm del gen diana, de forma que, tras su unión a él, induce la unión de una proteína de la familia Argonauta del complejo RISC-siRNA que degrada específicamente dicho ARNm (Song y col. 2004).

Para el silenciamiento de *dupα7* en células SH-SY5Y se utilizaron 3 parejas de siRNA. Dos de ellas, fueron diseñadas por el Dr. Arturo Chavez Reyes del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (México), fueron sintetizadas por la casa comercial Ambion (Tabla 12). La tercera pareja fue obtenida de la casa Qiagen junto a un siRNA control (no complementario a ninguna secuencia de ARNm concreta). La transfección de los siRNAs se realizó con el reactivo TransIT-TKO siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Brevemente, el proceso consistió en los siguientes pasos: 1) Siembra de las células (625.000 células por pocillo) en placas P6 en medio sin antibiótico 24 horas antes de iniciar el procedimiento; 2) Preparación de la solución de transfección (250 µl de medio de cultivo, 10 µl del reactivo y 5 µl del siRNA [20 µM]) el día del experimento; 3) Adición de la anterior solución a las células resuspendidas en medio de cultivo suficiente para obtener una concentración final de siRNA de 50 nM. Los experimentos fueron realizados 48 horas después de la transfección.

Tabla 12: Pareja de siRNAs utilizados para el silenciamiento génico.

Nombre	Sentido	Antisentido
siRNA-1	5'-CAACAUUAAGAUUACAAGUTT-3'	5'-ACUUGUAAUCUAAAUGUUGCG-3'
siRNA-2	5'-CGGUGGAGUCGGUUAUAAATT-3'	5'-UUUAUAACCGACUCCACCGAC-3'
siRNA-3	5'-CCAUUAUUGACAAUCCAAATT-3'	5'-UUUGGAUUGUCAUAAUGGGG-3'

5. ANÁLISIS DE COLOCALIZACIÓN DE SUBUNIDADES NICOTÍNICAS CON LA MEMBRANA CITOSÓLICA POR MICROSCOPIA CONFOCAL.

Este análisis se realizó en células transfectadas con las construcciones conteniendo los ADNc de $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ fusionadas a proteínas fluorescentes, $\alpha 7$ -pmCherry-N1-GFP y dup $\alpha 7$ -pEGFP. La membrana celular fue marcada *in vivo*, 48 horas después de la transfección, con el marcador WGA (lectina con capacidad de unión a las glicoproteínas de la membrana) conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 647. Las células fueron incubadas 10 minutos a 37 °C con la solución HBSS conteniendo el WGA a la concentración de 5 μ g/ml. A continuación, se fijaron las células con PFA al 4 % durante 8 minutos a temperatura ambiente y, finalmente, tras varios lavados con PBS, se montaron los cubreobjetos con el medio Prolong Gold Antifade Reagent.

Las imágenes de las células fueron captadas con el microscopio confocal Leica TCS SP5 utilizando el programa LAS AF- Process Tool “Colocalization”. Este microscopio fue el utilizado para todos los experimentos que requirieron microscopía confocal a lo largo de esta tesis. El microscopio pertenece a los Servicios Centrales de Microscopía Óptica y Confocal de la Universidad Autónoma de Madrid. Para el estudio cuantitativo de la colocalización se recurrió a la herramienta JACoP (Just Another Colocalization Plugin) del programa Image J que permite, a través de los coeficientes de Pearson y Manders, establecer la correlación entre los 2 marcadores del ensayo (Bolte y Cordelières 2006).

6. TÉCNICA DE TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE RESONANCIA DE FÖSTER ENTRE FLUOROCROMOS (FRET).

La posible interacción física entre dos subunidades del nAChR no puede llegar a establecerse con rotundidad mediante ensayos de colocalización; por ello, procedimos a realizar experimentos de FRET que sí permiten corroborar dicha interacción. Esta última técnica se basa en la transferencia de energía entre dos fluorocromos (donador y aceptor), utilizados para marcar las proteínas de interés donde el donador excitado transfiere parte de la energía emitida al aceptor provocando su excitación (Förster T. 2006). Para que la

anterior reacción se produzca se requieren dos condiciones indispensables: 1) las dos proteínas marcadas deben encontrarse muy próximas, entre 10 y 100 Å (Hevekerl y col. 2011; Pollok y Heim 1999; Heyduk 2002); y 2) los espectros de emisión del donador y de excitación del aceptor deben solaparse (Fig. 33).

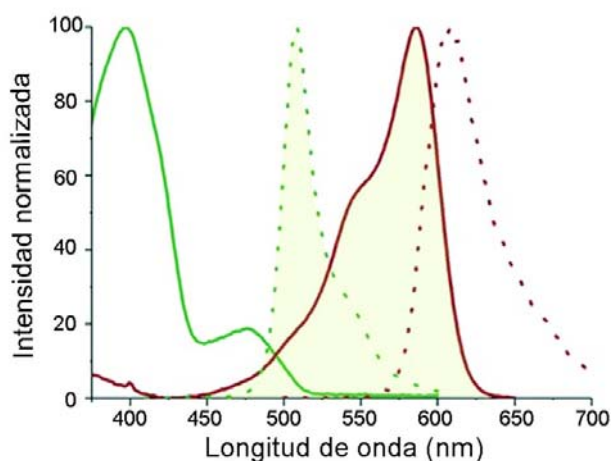


Figura 33: Espectros de emisión y excitación de GFP y mCherry. Se muestran los espectros de excitación (línea continua verde) y de emisión (línea discontinua verde) de GFP junto con los espectros de excitación (línea continua roja) y de emisión (línea discontinua roja) de mCherry. La zona coloreada en amarillo muestra el solapamiento entre los espectros de emisión de GFP y excitación de mCherry, lo cual permite la transferencia de energía entre ambos fluorocromos.

En base al fundamento anterior, si las dos proteínas están interaccionando físicamente, se establece que la aplicación de pulsos intensos de luz, que destruyen al aceptor por fotoblanqueo, producirá un incremento en la fluorescencia emitida por el donador al no tener un aceptor al que transferir su energía.

En la presente tesis se utilizó la técnica de FRET en las células GH4C1, RAW 264.7 y SH-SY5Y transfectadas con las parejas de construcciones $\alpha 7$ -pEGFP:dup $\alpha 7$ -pmCherry-N1 o $\alpha 7$ pmCherry-N1-GFP:dup $\alpha 7$ -pEGFP, en distintas proporciones. Para realizar el ensayo de FRET y su posterior visualización por microscopía confocal, las células fueron previamente fijadas con PFA 4 % durante 10 minutos, lavadas con PBS, y los cubreobjetos montados con el medio Citifluor AF-2. Las imágenes confocales fueron captadas, antes y después del fotoblanqueo del aceptor, en regiones de interés seleccionadas (ROI), en las que se determinó la intensidad de la fluorescencia. El fotoblanqueo de $\alpha 7$ -Cherry o dup $\alpha 7$ -Cherry se realizó con el láser de 561 nm a la

potencia del 75 % (GH4C1 y SH-SY5Y) o del 90 % (RAW 264.7). Por su parte, la fluorescencia de $\alpha 7$ -GFP o dup $\alpha 7$ -GFP se excitó con el láser de 488 nm. La eficiencia de FRET se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{FRET}_{\text{ef}} = 1 - (D_{\text{pre}} / D_{\text{post}})$$

Donde D_{pre} y D_{post} representan la fluorescencia de excitación del donador, antes y después del fotoblanqueo, respectivamente. Para estas determinaciones se usó el programa de análisis LAS AF-Wizard FRET Acceptor Bleaching.

7. TÉCNICA DE CITOMETRÍA PARA ANALIZAR EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE $\alpha 7$ -nAChRs FUNCIONALES EN LA MEMBRANA CELULAR.

Células RAW 264.7, nucleofectadas con distintas construcciones de dup $\alpha 7$ (dup $\alpha 7$ -myc o dup $\alpha 7$ -Cherry) fueron despegadas de la placa 48 horas después de la transfección. Tras centrifugar a 1000 rpm durante 5 min, las células transfectadas con dup $\alpha 7$ -myc fueron resuspendidas e incubadas durante 40 min a 4 °C en el medio de cultivo conteniendo el anticuerpo primario anti-myc (1:200). Transcurrido este periodo, las células fueron incubadas con el antagonista selectivo del $\alpha 7$ -nAChR, α -bungarotoxina (Bgtx), conjugado con el fluoróforo Alexa 488 a [1 μ M]. La incubación con α -Bgtx se realizó, tanto en las células transfectadas con dup $\alpha 7$ -myc como en aquellas transfectadas con dup $\alpha 7$ -Cherry. La expresión de dup $\alpha 7$ -myc en membrana fue evaluada con el anticuerpo secundario unido a un fluoróforo Alexa 546 (1: 600). La expresión de dup $\alpha 7$ -Cherry en membrana se monitorizó a 690 nm. Para desechar las células muertas en el análisis de citometría posterior, se procedió al marcaje de los núcleos celulares con DAPI. Finalmente, las células fueron resuspendidas en un volumen de 300 μ l de PBS, procediéndose al análisis en el citómetro BD FACS Canto II equipado con el software BD FACS Diva versión 6.1.2. Los datos obtenidos se evaluaron con el programa FLOW JO 7.6.5 del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de nuestra Universidad.

8. PREPARACIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON EXPRESIÓN ESTABLE DE dup α 7-myc.

8.1 Transfección y selección de clones positivos.

Las células SH-SY5Y fueron transfectadas o nucleofectadas con las construcciones dup α 7.pcDNA3.1/myc-his o pcDNA3.1/myc-his (vector vacío) de acuerdo a los protocolos descritos previamente. El plásmido pcDNA 3.1/myc-his contiene un gen de resistencia al antibiótico G418, lo cual nos permite utilizar este antibiótico para seleccionar las células que han incorporado dicho plásmido y, por tanto, los clones con expresión estable de dup α 7-myc (Southern y Berg 1982).

El procedimiento de selección de los clones de interés se describe brevemente a continuación. Las células transfectadas son sembradas a baja confluencia en placas P-100. Tras la adición del antibiótico G418 (800 μ g/ml), se aislaron células individuales que crecían en dicho medio; alrededor de cada célula aislada se permitió crecer células idénticas genéticamente a ella (clon). Como control negativo, se utilizaron células sin transfectar expuestas a la misma concentración de antibiótico, lo cual nos permitía determinar el tiempo mínimo de incubación con el antibiótico requerido para seleccionar las células que expresaban la construcción. Se necesitó un tiempo aproximado de 2-3 semanas de exposición a G418 para que los clones alcanzaran el tamaño adecuado. Transcurrido dicho periodo, se procedió a la toma de las células del clon utilizando cilindros de clonación (Sigma-Aldrich, Alemania) (Fig. 34). Cada clon se depositó en un pocillo independiente (placa multipocillos P-24) conteniendo 1 ml de medio completo más el antibiótico de selección. Cuando las células de cada clon alcanzaron la confluencia, se transfirieron a una placa P-60 y se dejaron crecer antes de proceder a evaluar si la sobreexpresión de dup α 7-myc se habría producido. Este último análisis se realizó mediante dos técnicas que son descritas a continuación.

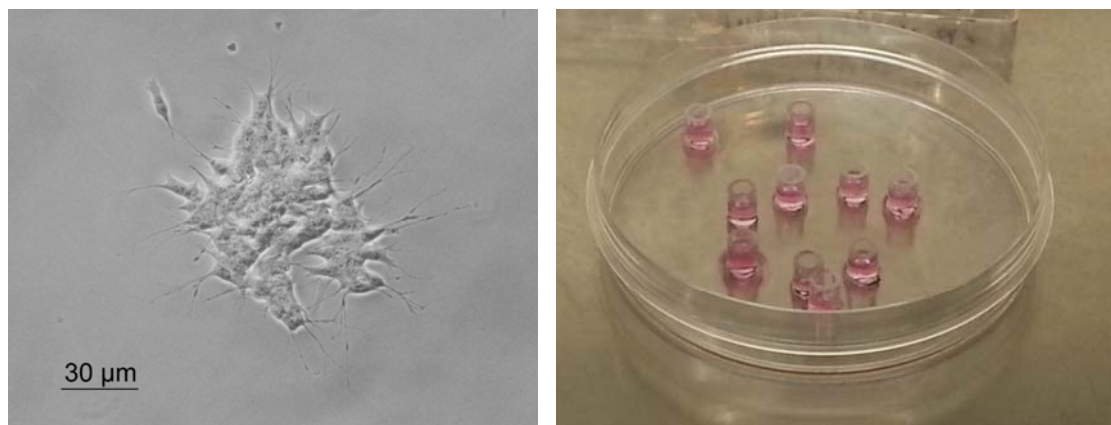


Figura 34: Selección de clones con sobreexpresión de dupα7-myc. A) Fotografía de un clon de células SH-SY5Y con la misma carga genética. B) Proceso de tripsinización de los diferentes clones aislados mediante cilindros de clonación.

Una vez los clones fueron aislados y seleccionados, se mantuvo el G418 en el medio para evitar el crecimiento de células sin plásmido en los pases sucesivos, aunque a una concentración inferior a la inicial (250 $\mu\text{g/ml}$).

La expresión de dupα7-myc en los clones seleccionados fue evaluada en distintos momentos a lo largo del desarrollo de esta tesis con objeto de comprobar que los niveles de expresión de la subunidad sobreexpresada no se modificaban con los sucesivos pases celulares. Se utilizaron dos procedimientos para evaluar la expresión de dupα7-myc: inmunohistoquímica y PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). El primero de estos procesos se describe a continuación, mientras que el segundo será detallado en el apartado siguiente.

8.2 Confirmación de clones positivos mediante inmunocitoquímica

El protocolo seguido fue similar al descrito previamente por nuestro grupo (Solis-Garrido y col. 2004; Serantes y col. 2006), con algunas modificaciones.

A partir de los clones aislados y crecidos en pocillos P-24, se tomaron alrededor de 80.000 células para sembrar en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina. Tras 48 horas, las células fueron fijadas 3 min con metanol y, a continuación, sometidas a una batería de alcoholes de graduación descendente (100°, 90°, 70°) y H₂O. Las células fueron permeabilizadas con 0,2 % Tritón X-100 durante 10 min a temperatura ambiente y agitación suave. Tras un exhaustivo lavado, las células fueron incubadas 2 h con el anticuerpo primario anti-myc (1:200), seguido de la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Alexa-Fluor-488 (1: 400; 1h). Tras varios lavados, se procedió a la tinción del núcleo mediante incubación con DAPI (1:3000);

durante 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos con el medio Prolong Gold Antifade Reagent y a la visualización de las células con el microscopio confocal. Como control negativo, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente en células no transfectadas.

9. TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-qPCR).

Esta técnica permite determinar el nivel de expresión de distintos genes de interés con gran exactitud y reproducibilidad. A lo largo de esta tesis, esta técnica ha sido utilizada para cuantificar los niveles de expresión de los mensajeros correspondientes a distintas subunidades del nAChR en varias líneas celulares (SH-SY5Y y C13NJ); así como en células de sangre periférica de pacientes con depresión mayor. También se ha utilizado para corroborar el silenciamiento génico de $\text{dup}\alpha 7$ endógeno con siRNA en células SH-SY5Y.

9.1 Extracción de ARN y transcripción reversa (RT).

Tanto la extracción de ARN total (ARNt) de cultivos celulares como de células sanguíneas de pacientes se realizó de acuerdo al procedimiento descrito previamente por nuestro grupo (de Lucas-Cerrillo y col. 2011; Maldifassi y col. 2014; Cedillo y col. 2015). Brevemente, la extracción del ARNt de cultivos celulares de SH-SY5Y se realizó con el kit comercial RNeasy Mini Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción de ARNt de células sanguíneas de pacientes depresivos se realizó en la muestra de sangre, recogida el mismo día, utilizando el kit QIAamp RNA Blood Mini Kit. El ARNt extraído se cuantificó por espectrofotometría, evaluándose la calidad del mismo a través de su valor de absorbancia $A_{260/280}$, el cual debe estar dentro del rango 1,8 - 2. El ARNt se alicuotó y almacenó a - 80 °C hasta su uso.

Para la RT se utilizó el kit Taqman Reverse Transcription Reagents partiendo de 500 ng de ARNt (líneas celulares) o 300 ng (de pacientes). Cada reacción contenía Taqman RT Buffer (1X), 5,5 mM MgCl_2 , 500 μM dNTPs, 2,5 μM cebadores aleatorios (random primers), 2,5 μM oligo dT, 0,4 U/ μl inhibidor de ARNasa y 1,25 U/ μl enzima transcriptasa reversa. El volumen de la reacción se completó hasta 20 μl finales con agua

libre de ARNasas. El programa de RT llevado a cabo en el termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc) consistió en 10 min a 25 °C (incubación), 30 min a 48 °C (retrotranscripción) y 5 min a 95 °C (inactivación de la reacción). El ADNc obtenido se alicuotó y almacenó a -20 °C hasta su uso.

9.2 PCR cuantitativa (qPCR)

Para esta determinación se usó el método de SYBR Green, el cual se basa en la interacción del fluoróforo con el ADN de doble hebra. Este método permite cuantificar, a tiempo real, la amplificación de la secuencia de ADN flanqueado por los cebadores (Wittwer y col. 2013).

Cada reacción llevada a cabo en pocillos correspondientes a placas de 96, se realizó por triplicado. Para cada reacción se utilizó un volumen final de 11 µl conteniendo 5 µl SYBR Green (iTaQ Fast SYBR Green Supermix), 5 µl ADNc (36 ng para las líneas celulares o 21 ng para pacientes) y 0,5 µl de cebadores (a la concentración más eficiente determinada previamente). Las condiciones de amplificación consistieron en: 30 s a 95 °C, 40 ciclos de 5 s a 95 °C y 30 s a 60 °C. Para la amplificación se utilizó el equipo ABI Prism 7500 con el software SDS 2.0.6. (Sequence Detection System, Applied Biosystems). La temperatura de desnaturalización (“Curva de Melting”) sirvió para asegurar que, en las condiciones utilizadas, solo se amplificaba el producto deseado. La expresión de los genes estudiados se cuantificó por el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando genes de referencia para normalizar la expresión de los genes evaluados. Como genes de referencia se utilizaron el $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2M$), ubiquitina C (UBC) y el gen de la anemia diseritropoyética congénita ($CDANI$) (Vandesompele y col. 2002; Chari y col. 2010). Por su parte, los cebadores utilizados para amplificar los distintos genes, así como el tamaño de los fragmentos amplificados (en pares de bases, pb) se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Oligonucleótidos usados en la amplificación de los genes señalados.

Gen	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>CHRNA7</i>	GCTGCAAATGTCTTGGACAGAT AACAGTCTTACCCCTGGATAT	70	Cedillo y col. 2014
<i>CHRFAM7A</i>	CAATTGCTAATCCAGCATTTGTGG CCCAGAAGAATTCACCAACACG	102	Bordás y col. 2017
<i>CHRNA3</i>	CAGAGTCCAAAGGCTGCAAG AGAGAGGGACAGCACAGCAT	149	Lips y col. 2005
<i>CHRNA5</i>	CTTCACACGCTTCCCAAACCT CTTCAACAACCTCACGGACA	187	Lips y col. 2005
<i>CHRNA9</i>	AAAGATGAACTGGTCCCATTTCCT AAGGTCATTAAACAACCTTCTGAGCATAT	118	Lam y col. 2007
<i>CHRB2</i>	CTGGATCCTTCCCGCTACAAC TGGGTCAGCCAGACATTGGT	146	Lam y col. 2007
<i>CHRNA4</i>	TCACAGCTCATCTCCATCAAGCT CCTGTTTCAGCCAGACATTGGT	100	Lam y col. 2007
<i>B2M</i>	TGCCTGCCGTGTGAACCATGT TGCGGCATCTTCAAACCTCCTCCATGA	97	Chari y col. 2010
<i>UBC</i>	GTTCCGTCGCAGCCGGGATT TGCATTGTCAAGTGACGATCACAGC	71	Chari y col. 2010
<i>CDNA1</i>	GTTCCAAAGCATCCACGATT TTCAAGGTCCCTTTGTCCAG	93	Vandesompele y col. 2002

10. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA CELULAR POR INMUNOBLLOT

El análisis de la expresión proteica en las células se realizó mediante la técnica de inmunoblot, tal como ha sido descrito previamente (Maldifassi y col. 2014). Las células, mantenidas en cultivo durante 48 horas, fueron lisadas con la solución de lisis recogida en la tabla 4. El lisado fue recogido en tubos eppendorf que se sometieron a una agitación en rotor orbital vertical (2 horas) y posteriormente a una centrifugación (13.000 rpm, 30 min). Los extractos proteicos sobrenadantes fueron alicuotados y guardados a -80 °C hasta su uso. La determinación de la concentración de proteínas en los anteriores extractos fue realizada por el método colorimétrico del ácido bicinónico, basado en la reacción de Biuret, siguiendo las instrucciones del kit BCA Protein Assay. La absorbancia fue medida en un lector Fluostar Optima (BMG, Alemania) a la longitud de

onda de 562 nm en placas de 96 pocillos. Las proteínas fueron cargadas en geles de poliacrilamida 7 % en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE) y sometidas a electroforesis. Previamente a ser cargadas en el gel, las proteínas fueron desnaturizadas a 95 °C (4 min). Las proteínas, separadas por su peso molecular, fueron transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron incubadas 2h previamente con solución de bloqueo de TTBS con 5 % de leche descremada y 5 % de BSA, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Los anticuerpos primarios, diluidos en la anterior solución de bloqueo, fueron incubados a las diluciones recogidas en la tabla 10. Posteriormente, se procedió a la incubación de la membrana con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con la enzima HRP. La proteína marcada fue identificada con el sustrato ECL Plus, mediante películas radiográficas. La cuantificación de las bandas obtenidas se realizó con el programa Image J (NIH, EEUU), utilizando la proteína β -actina como control de carga proteica.

11. SEÑALES DE Ca^{2+} INTRACELULARES POR SONDAS FLUORESCENTES

Fluo 4 y Fura 2 constituyen dos indicadores muy utilizados para medir, por fluorescencia, la concentración intracelular de Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en muchos tipos celulares. Los derivados acetoximetiléster de ambas sondas (Fluo 4-AM y Fura 2-AM) son permeables a la membrana, por lo que pueden cruzar la misma para una, vez en el interior celular, ser degradados por las esterasas endógenas que separa al éster de la sonda (Simpson 1999).

11.1 Poblaciones celulares

Las células fueron sembradas en placas negras de 96 pocillos a la densidad de 50.000 células/pocillo. A las 48 horas de la siembra, las células fueron cargadas, durante 45 min a 37 °C en oscuridad, con 4 μM de Fluo 4-AM y 0,02 % de ácido plurónico F-127. Este último es un agente tensoactivo no iónico que favorece la carga de la sonda en la célula. Tras eliminar la sonda mediante varios lavados, las células fueron estimuladas de diversa formas para inducir el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Las placas fueron medidas en un lector de fluorescencia Fluostar Optima (BMG, Alemania) a las longitudes de onda de

excitación/emisión de 485/520nm. Este equipo permite inyectar un determinado estímulo y hacer un curso temporal posterior de las variaciones de fluorescencia (Fig. 35).



Figura 35: Desarrollo experimental seguido para la medida de fluorescencia en poblaciones celulares cargadas con Fluo 4 -AM. Durante los primeros 5 s se realizó la lectura de la fluorescencia a intervalos de 1s. La aplicación del estímulo (flecha roja), a los 5-6s, vino seguida de una agitación suave de la placa. Tras el estímulo, se procedió a realizar sucesivas determinaciones durante 30 s a intervalos de 0,5 s.

Finalizado el experimento, se añadió a cada pocillo 50 µl de una solución de tritón X-100 al 10 % para la obtención de la fluorescencia máxima ($F_{\text{máx}}$) en cada pocillo y después 50 µl de MnCl_2 para la obtención de la fluorescencia mínima ($F_{\text{mín}}$). Con los datos obtenidos se aplicó la siguiente fórmula:

$$(F_p - F_0) / (F_{\text{máx}} - F_{\text{mín}}) \times 100$$

Siendo F_p el pico de fluorescencia registrada en el equipo en respuesta al estímulo, y F_0 el punto menor de fluorescencia obtenido a lo largo de la medida. Cada valor experimental se determinó por triplicado. Con los valores obtenidos se construyeron curvas dosis-respuesta utilizando el programa GraphPad Prism 5 y los correspondientes análisis estadísticos.

11.2 Célula única

La sonda Fura 2-AM es una sonda radiométrica derivada del quelante de Ca^{2+} BAPTA que fue desarrollada por Roger Y. Tsien (Tsien y col. 1985). Su pico máximo de absorción (excitación) oscila entre 340 nm, cuando se encuentra unida a Ca^{2+} , y 380 nm cuando se encuentra en su forma libre. Así, el ratio de emisión de la sonda, determinado tras excitar a esas longitudes de onda ($\Delta F_{\text{Ratio}} = 360/380 \text{ nm}$), está directamente relacionado con la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Grynkiewicz y col. 1985; Paredes y col. 2008).

Las células fueron sembradas en cubreobjetos depositados en placas multipocillos P-24 a la densidad de 15.000 células/pocillo. Tras 48 horas de reposo, las células se incubaron con 4 μM de Fura 2-AM y 0,02 % de ácido plurónico durante 45 min a 37 °C. Tras el lavado de los cubres, éstos se montaron en una cámara conectada a un sistema de perfusión anexo a un microscopio invertido Axiovert 200 provisto de filtros adecuados para excitar la sonda y aislar su emisión (XF04-2; Omega Optical). Las células fueron excitadas, alternativamente, con las longitudes de onda 360 y 380 nm durante 500 ms, y la señal emitida se adquirió a 510-520 nm, a la frecuencia de 0,5 Hz. La señal generada (ΔF_{Ratio}) representa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a tiempo real. Los datos de fluorescencia fueron adquiridos con el programa HCLImage (Hamamatsu Photonics) y los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5. Los datos se normalizaron respecto a su fluorescencia basal (F_0), calculando la amplitud de la señal como la diferencia entre la fluorescencia basal y la del pico de máxima respuesta (ΔF_{Ratio} pico). El tiempo al pico (s) corresponde con la diferencia de tiempo entre la aplicación del estímulo y la obtención del pico máximo de fluorescencia. La τ de caída (s) fue calculada como el tiempo transcurrido desde el pico máximo de fluorescencia hasta que se da por normalizada la fluorescencia. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (22-25 °C).

12.DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN CÉLULA ÚNICA CON LA SONDA FM1-43.

En la década de 1990, William J. Betz desarrolló un método de marcaje de vesículas sinápticas que permitía visualizar, por microscopía óptica, los procesos de exocitosis y los procesos de endocitosis fruto de la interacción de dichas vesículas con la membrana plasmática. El método recurre a la utilización de una sonda fluorescente capaz de marcar la membrana de células vivas, al carecer de toxicidad. De esta manera, la sonda permite identificar procesos de exocitosis, así como explorar los mecanismos de reciclado vesicular (Betz y col. 1996). En este estudio se ha utilizado la sonda FM1-43 que presenta una estructura anfipática compuesta por dos grupos, una cabeza hidrofílica y una cola lipofílica. La cabeza, cargada positivamente, hace que la molécula no pueda atravesar la

membrana, mientras que la cola determina la hidrofobicidad de la sonda y su cinética de lavado (Klingauf y col. 1998).

Las células fueron sembradas en cubreobjetos depositados en placas P-24 a una densidad de 15.000 células/pocillo. Tras 48 horas, las células fueron cargadas con la sonda FM1-43 (4 μ M, 4 min) unida a la membrana tras producir la endocitosis de la misma con una solución despolarizante (100 mM K^+) (pasos b-d de la figura 36). A continuación, las células fueron lavadas para eliminar el exceso de FM1-43 (paso e) y, seguidamente, los cubreobjetos fueron montados en la cámara de perfusión, para que las vesículas celulares fueran exocitadas tras someter a las células a un nuevo estímulo (activación del $\alpha 7$ -nAChR) (paso f).

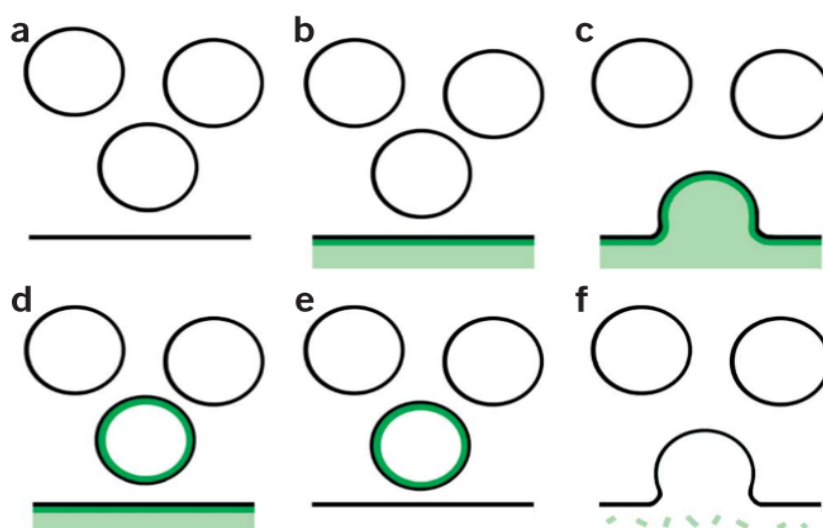


Figura 36: Registro de la endocitosis/exocitosis vesicular en células marcadas con la sonda FM1-43. (a) Vesículas sinápticas cerca de la membrana. (b) Adición del FM1-43 que se une a la membrana citosólica exteriormente y mostrando fluorescencia. (c-d) Las células son cargadas con la sonda FM1-43 unida a membrana mediante la aplicación de un estímulo (100 mM K^+) que produce la endocitosis de la membrana y el marcaje de vesículas sinápticas en su cara interior. (e) Lavado de las células para eliminar el FM1-43 extracelular. (f) Las células, nuevamente estimuladas, con el agonista del $\alpha 7$ -nAChR, exocitan las vesículas produciendo caída de la fluorescencia al liberar el FM1-43, que estaba en el interior vesicular, al medio extracelular. Tomado de (Gaffield y Betz 2006).

Estos experimentos fueron llevados a cabo en un microscopio invertido Axiovert 200, equipado con un objetivo 63X PlanNeofluar de aceite de inmersión. Las imágenes se capturaron con una cámara CCD ORCA-R² de alta resolución. Todo el dispositivo era controlado con el programa HImage, con el cual se estableció la adquisición de las imágenes del registro. La exocitosis fue medida en regiones de interés (ROI) en las

distintas capturas (fotografías) del proceso realizadas a intervalos de tiempos (t) de 0,5 Hz y con un tiempo de exposición de cada captura de 200 ms. Para el cálculo de la fluorescencia neta en el ROI de interés, se sustrajo la fluorescencia de fondo (*background*) determinada en un ROI adyacente a la célula analizada. Para ello, se aplicó la siguiente fórmula:

$$F_0(t) = F_{\text{inicial}}(t) - F_b(t)$$

Donde $F_{\text{inicial}}(t)$ y $F_b(t)$ corresponden, respectivamente, a la fluorescencia en el ROI de interés y a la fluorescencia de fondo en un instante dado (t). Una vez obtenida la fluorescencia neta, se calculó la diferencia de fluorescencia, en valor absoluto, entre el inicio y el final de cada registro (ΔF). Para su representación, los valores absolutos se normalizaron respecto a la fluorescencia basal (F_0), expresándose como unidades arbitrarias (u.a) utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta F/F_0(\text{u.a.}) = (F_F - F_0) / F_0(\text{u.a.})$$

Donde F_F es el punto del registro para el cual la pendiente de la curva de fluorescencia llega a 0 (descarga completa de FM1-43).

13. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE DOPAMINA EN POBLACIONES CELULARES POR LA TÉCNICA DE ELISA.

A pesar de que las SH-SY5Y son consideradas como un buen modelo de neuronas dopaminérgicas (Biedler y col. 1978; Kovalevich y Langford 2013), mientras mantienen un fenotipo no diferenciado (neuroblastos), la liberación de DA endógena inducida por los estímulos es difícilmente detectable (Xie y col. 2010). Para solventar esta limitación, en este trabajo se ha procedido a preincubar las células con DA exógena para favorecer el almacenamiento vesicular de la misma e incrementa la amina liberada en respuesta a la estimulación celular (Mastroeni y col. 2009). Así, inmediatamente antes de comenzar el experimento, las células, sembradas en placas P-6 (500.000 células/pocillo), fueron lavadas con medio fresco conteniendo 0,2 mM de ascorbato sódico y, posteriormente,

preincubadas con una solución 20 nM de DA durante 20 minutos a 37 °C. Tras el lavado, las células fueron estimuladas para inducir la liberación exocitótica del neurotransmisor. Se utilizó como liberación basal la producida por células del mismo cultivo no sometidas a estimulación. Se recogieron los sobrenadantes ($\approx 400 \mu\text{l}$) en un eppendorf conteniendo 40 μl de un estabilizador, proporcionado por el kit de ELISA, que evitaba la degradación de la dopamina. El sobrenadante se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos y se guardó a -80°C hasta su cuantificación por el método de ELISA. Las células remanentes en la placa fueron lisadas para determinar la concentración de proteína en cada pocillo. Los valores de liberación de DA, expresada en pg, fueron normalizados respecto a la concentración de proteína en cada pocillo.

La técnica de ELISA consiste en un inmunoensayo en el cual el antígeno (en nuestro caso dopamina), inmovilizado en un soporte sólido, es detectado por un anticuerpo ligado a una enzima capaz de degradar un sustrato y producir una reacción colorimétrica (Fig. 37). En nuestro caso, se utilizó un ELISA competitivo que tiene la ventaja de detectar pequeñas cantidades del antígeno en muestras de volumen reducido. Siguiendo las indicaciones del kit utilizado (Dopamine High Sensitive ELISA, DLD Diagnostika, Alemania) se determinó la concentración de DA en 300 μl del sobrenadante correspondiente a cada condición experimental. La concentración se calculó a partir de los valores de absorbancia medidos en el lector de placas FluOstar Optima (BMG, Alemania) utilizando una recta patrón elaborada con concentraciones decrecientes conocidas de dopamina. El límite de detección de nuestro ensayo fue de 4,53 pg/ml.

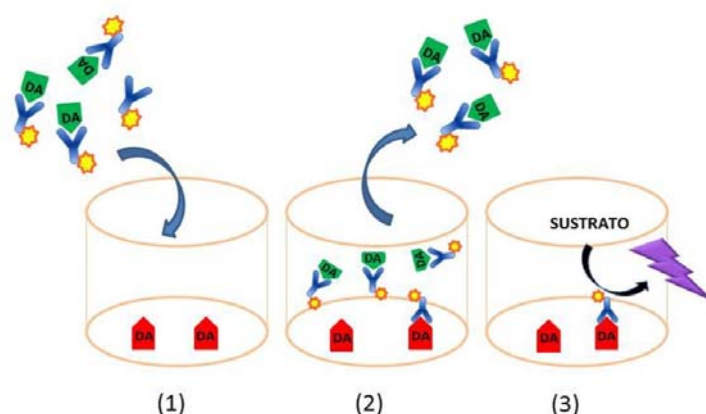


Figura 37: Esquema del procedimiento seguido con la técnica de ELISA competitivo. La muestra, conteniendo la DA liberada, fue incubada con el anticuerpo conjugado con la enzima. (1) Adición de la muestra a los pocillos donde se encuentra inmovilizado el antígeno, (2) Lavado del pocillo para eliminar los complejos antígeno/anticuerpo y (3) una sola adición del sustrato que degradará la enzima dando color a la solución.

14. MEDIADORES INFLAMATORIAS UTILIZADOS PARA ENSAYAR SU EFECTO SOBRE LA EXPRESIÓN DE $\alpha 7$ Y $\text{dup}\alpha 7$ ARNm

Para la estimulación con los mediadores inflamatorios, las células (700.000 células SH-SY5Y y 300.000 células C13NJ) fueron sembradas en placas P-60, 24 horas antes con medio completo y, posteriormente, se dejaron toda la noche sin SFB. La incubación con las citoquinas se realizó durante 24 y 48 horas. Tras este periodo de tiempo, se realizó la extracción de ARNm. Con el fin de minimizar interacciones, el medio usado como vehículo para la administración de las citoquinas contenía 1 % de SFB. Las concentraciones utilizadas se han basado en los niveles descritos en la bibliografía procedentes de estudios *in vitro* e *in vivo* (Tabla 14).

Tabla 14: Concentraciones utilizadas de las citoquinas.

Citoquinas	Concentración	Referencias
TNF α	50 ng/ml	(Ogawa et al. 2012, Tsianakas et al. 2012, Szczepanik, Ringheim 2003, Dutta et al. 2012, Kondo et al. 2010)
IL-1 β	25 ng/ml	
IL-6	50 ng/ml	
IL-10	10 ng/ml	

15. FÁRMACOS ANTIDEPRESIVOS UTILIZADOS PARA ENSAYAR SU EFECTO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS SUBUNIDADES NICOTÍNICAS

Para analizar el efecto de los fármacos sobre la expresión génica de diversas subunidades del nAChR, las células fueron sembradas de la siguiente forma, dependiendo del posterior análisis a realizar: 1) Las líneas celulares SH-Y5Y y C13NJ fueron sembradas en medio completo a una densidad de 700.000 y 300.000 células, respectivamente, en placas P-60 para la extracción de ARN; 2) Para el ensayo de MTT se sembraron, en el mismo medio 40.000 células SH-SY5Y y 8.500 C13NJ en placas P-96. Las células fueron sembradas con medio completo 24 horas antes de la adicción del fármaco. Veinticuatro horas después de la siembra, las células fueron incubadas con los respectivos fármacos por periodos de 24, 48 h, 7 días y 15 días. La incubación se llevó a cabo con 1 % SFB. Los tiempos de exposición a los fármacos fueron: 24 y 48 horas para ensayos a corto plazo y; 7 y 15 días para evaluar el efecto a medio plazo. Las concentraciones de cada fármaco fueron seleccionadas en base a las concentraciones usadas en experimento *in vitro* previos que no fueran lesivas para la célula y/o atendiendo a la concentración plasmática alcanzada por dichos fármacos en los pacientes (Tabla 15).

Tabla 15: Concentraciones utilizadas de los fármacos ensayados

Fármaco	Concentración	Referencia
ANTIDEPRESIVOS		
Imipramina	10 μ M	(Gil-Ad y col. 2008; Jantas y col. 2014; Freitas y col. 2015; Donnici y col. 2008; Bielecka y Obuchowicz 2016)
Tranilcipromina	10 μ M	
Fluoxetina	1 μ M	
Reboxetina	10 μ M	

Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Este ensayo se basa en la reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de color amarillo, en un compuesto de la familia de los formazanos, de color azul-violeta. Esta reducción la puede llevar a cabo la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Esta actividad metabólica mitocondrial solo se

produce en células vivas, por lo que, el ensayo de MTT es un método muy utilizado para determinar supervivencia y proliferación celular.

El protocolo del experimento se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Roche). Brevemente, el reactivo MTT, añadido a células sembradas en placas P 96, fue incubado 4 horas a 37°C. Seguidamente, se sustituyó el medio por 150 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar los cristales de formazán formados. La absorbancia (Abs) medida en un espectrofotómetro la longitud de onda de 540 nm. Todas las condiciones experimentales, tanto en células tratadas como sus respectivos controles sin tratar, se realizan por triplicado. El porcentaje de viabilidad celular se calcula de la siguiente forma:

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{Abs células tratadas} \times 100) / \text{Abs células control}.$$

16. SELECCIÓN DE PACIENTES CON DEPRESIÓN MAYOR Y EXTRACCIÓN DE SANGRE.

Los pacientes que constituyen el grupo de estudio (n = 24) fueron diagnosticados de depresión mayor por el equipo de psiquiatría del Servicio de Salud Mental del Hospital Universitario “La Paz” de Madrid, siguiendo los criterios marcados por la quinta edición del manual de Diagnóstico estadístico de Trastornos Mentales (DSM-V) para el diagnóstico de la depresión mayor. Dicho servicio fue el encargado del seguimiento periódico de los pacientes reclutados. Todos los sujetos incluidos en el estudio se sometieron a un examen médico completo para descartar la presencia de otras patologías, de tipo inmune, inflamatorio o infeccioso. Otros motivos de exclusión fueron el sobrepeso > 10 % del IMC ajustado a su edad, género y estatura, tabaquismo, síndromes de inmunodeficiencia, enfermedades endocrinas, test positivo de embarazo y pacientes que, en las dos últimas semanas, hubiesen sufrido procesos alérgicos, infecciosos o inflamatorios. Dentro de los sujetos diagnosticados con depresión mayor, se descartaron aquellos con otras enfermedades mentales concomitantes, como el desorden bipolar, la esquizofrenia, síndrome de Tourette, trastorno obsesivo compulsivo, estrés postraumático y adicción a drogas. El curso evolutivo de la depresión fue evaluado en los pacientes en una, dos o tres visitas, según los casos. En cada exploración se determinó la gravedad de la depresión de acuerdo a la escala de evaluación de la depresión de Hamilton (HAM-D) conteniendo 17 ítems (Ramos-Brieva y Cordero Villafafila 1986) (Anexo 2). Esta escala

ofrece una medida cuantitativa de la intensidad del trastorno depresivo y permite cuantificar la respuesta al tratamiento en base a la remisión o no de los síntomas. La puntuación total de la escala abarca desde el 0 hasta los 32 puntos, con los siguientes grupos de corte:

- 0-7: No depresión
- 8-13: depresión ligera/menor
- 14-18: depresión moderada
- 19-22: depresión severa
- > 23: depresión muy severa

Simultáneamente, en cada visita, se procedió a la toma de muestra de sangre periférica con el paciente en ayunas. Las muestras de sangre obtenidas por venopunción fueron recogidas en 2 tubos distintos, uno para separar suero (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) y el otro para el aislamiento del ARNt (BD Vacutainer CPT). Los niveles séricos de las citoquinas de pacientes y controles fueron medidos usando el Quantikine ELISA kit (R&D Systems, MN, USA).

Como grupo control, se incluyeron 33 sujetos sanos, no fumadores, y sin antecedentes de enfermedades mentales en su historial médico. Todos los participantes firmaron la hoja de consentimiento informado tras ser informados por escrito del diseño y objetivo del estudio.

17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de la media (E.E.M). El análisis comparativo de dos grupos se realizó mediante el test de la t de Student o el test de U-Mann Whitney para los datos que tenían o no una distribución normal, respectivamente. En caso de comparaciones múltiples se utilizó el análisis de varianza de ANOVA, seguido de un análisis post-hoc utilizando el test de Bonferroni cuando era apropiado en muestras con distribución normal. Para las comparaciones ente grupos con distribución no normal se utilizó el test ANOVA Kruskal Wallis seguido del test post-hoc Dunn. Un valor $p \leq 0,05$ fue considerado el límite de significación estadística.

Resultados

1. LA SUBUNIDAD dup α 7 INTERACCIONA FISICAMENTE CON EL α 7-nAChR EN VARIAS LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFEROS.

Resultados previos de nuestro grupo habían demostrado que la nueva subunidad del nAChR, dup α 7, se comportaba como un modulador negativo de la actividad de α 7-nAChR en ovocitos de *Xenopus* después de la expresión heteróloga de ambas subunidades en el ovocito (de Lucas-Cerrillo y col. 2011). Sin embargo, cuando se inició la presente tesis, aún permanecían sin explorar las siguientes cuestiones: 1) ¿el anterior efecto de dup α 7 sobre el α 7-nAChR es fruto de la interacción física entre ambas subunidades nicotínicas?; 2) ¿se produce la anterior interacción α 7/dup α 7 en células de mamíferos, como serían las líneas celulares GH4C1, RAW 264.7 y SH-SY5Y?; y 3) en caso afirmativo, ¿tendría la interacción α 7/dup α 7 repercusión funcional? Los siguientes experimentos fueron diseñados para dar respuestas a todas esas cuestiones.

1.1 La transfección de dup α 7 en células GH4C1 reduce el número de α 7-nAChRs expresados en la membrana celular.

Para comenzar el estudio, se seleccionó la línea celular de pituitaria de rata, GH4C1, la cual no expresa endógenamente el α 7-nAChR, pero si tiene la capacidad de expresarlo heterológamente al disponer de la chaperona RiC3. Los primeros experimentos fueron diseñados para analizar la capacidad de expresión de ambas subunidades nicotínicas en la membrana celular, tanto de forma separada como cuando eran coexpresadas. Para ello, las células fueron transfectadas con las construcciones α 7-pmCherry-N1 y dup α 7-pEGFP por separado, o con la combinación de ambas en la proporción 1:1. El acceso de cada subunidad a la membrana celular, en cada condición experimental, fue visualizado por microscopía confocal tras marcar la membrana celular con la lectina WGA conjugada con el fluoróforo Alexa 647.

La “función de colocalización” del programa de análisis de imágenes del microscopio confocal Leica muestra una serie de puntos blancos que reflejan los sitios de colocalización de cada subunidad nicotínica con la membrana. Se observa como la expresión en membrana es alta para la subunidad α 7-Cherry y baja para dup α 7-GFP en el caso de que ambas construcciones hubieran sido transfectadas por separado (Fig. 38 A y B). Cuando ambas construcciones fueron cotransfectadas, se observa una reducción

significativa de la expresión de subunidades $\alpha 7$ -Cherry en membrana (Fig. 38 C, panel izquierda) en comparación con la observada en células transfectadas solo con $\alpha 7$ -Cherry (Fig. 38 A). Dicha reducción se produce a expensas del atrapamiento de subunidades $\alpha 7$ -Cherry, de nueva formación, en el RE por parte de subunidades dup $\alpha 7$ -GFP que permanecen retenidas en esta estructura celular sin poder migrar hacia la membrana (Fig. 38 C, color amarillo del panel derecho).

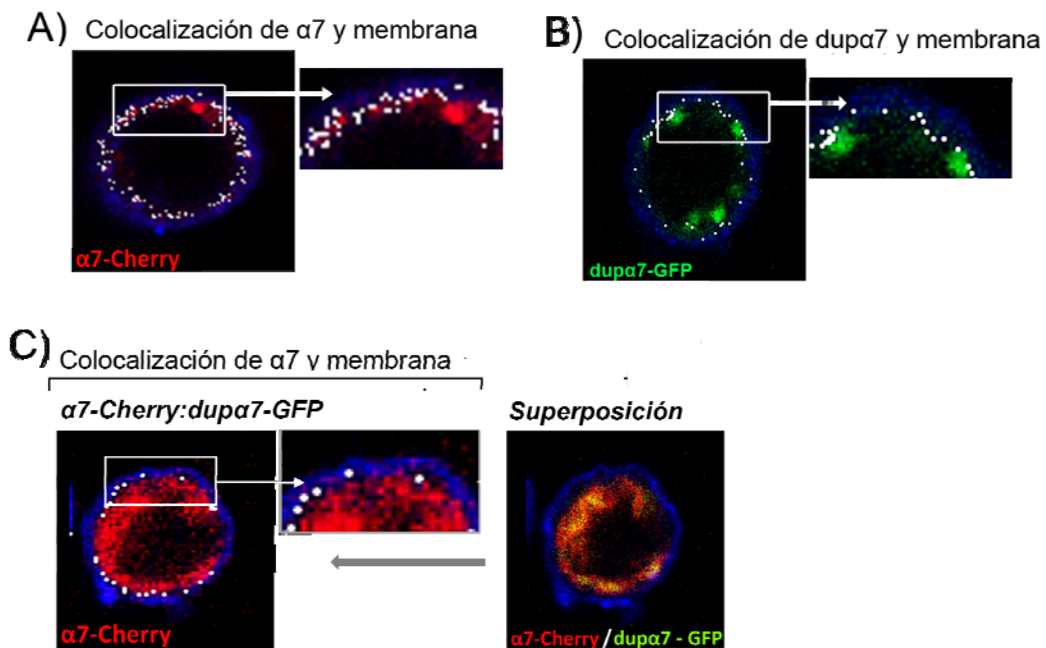


Figura 38: Análisis cualitativo de expresión de subunidades $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ en membrana citosólica de células GH4C1. A) Células transfectadas con la construcción $\alpha 7$ -Cherry (rojo) o B) con la construcción dup $\alpha 7$ -GFP (verde). La membrana marcada con WGA Alexa 647 aparece en azul. Los puntos blancos representan los sitios de colocalización de la subunidad nicotínica con la membrana. La imagen a la derecha de cada célula muestra la amplificación de la zona enmarcada por el rectángulo. C) Célula cotransfectada con las construcciones $\alpha 7$ -Cherry:dup $\alpha 7$ -GFP, donde se aprecia como la expresión de dup $\alpha 7$ disminuye los sitios de colocalización de subunidades $\alpha 7$ en la membrana (puntos blancos) debido al atrapamiento de estas subunidades en RE por parte de dup $\alpha 7$ (color amarillo en imágenes superpuestas).

Los coeficientes de correlación de Pearson y Manders fueron utilizados para analizar, de forma cuantitativa, el nivel de expresión en membrana de las subunidades $\alpha 7$ o dup $\alpha 7$, en ausencia o presencia de la otra subunidad. El coeficiente de Pearson toma valores desde -1 (correlación negativa perfecta) a 1 (correlación positiva perfecta), con el valor 0 indicando la falta de colocalización. Por su parte, el coeficiente de Manders oscila entre el valor 0 (no colocalización) al 1 (máxima colocalización). La Figura 39 muestran los valores de ambos coeficientes, expresados como media \pm E.E.M., obtenidos en cada

condición experimental. Se observa como los valores de los coeficientes de Pearson y Manders, referidos a la colocación de la subunidad $\alpha 7$ en membrana ($0,43 \pm 0,06$ y $0,57 \pm 0,04$), se reducen significativamente cuando la subunidad $\text{dup}\alpha 7$ es coexpresada ($0,07 \pm 0,02$ y $0,17 \pm 0,03$). Por su parte, ambos coeficientes arrojan unos valores muy bajos cuando se considera la coexpresión de la subunidad $\text{dup}\alpha 7$ en la membrana ($0,04 \pm 0,01$ y $0,13 \pm 0,02$), indicando que ésta última es prácticamente inexistente. La coexpresión de $\alpha 7$ incrementa ligeramente, pero sin alcanzar valores estadísticamente significativos, los sitios de colocación de subunidades $\text{dup}\alpha 7$ en membrana.

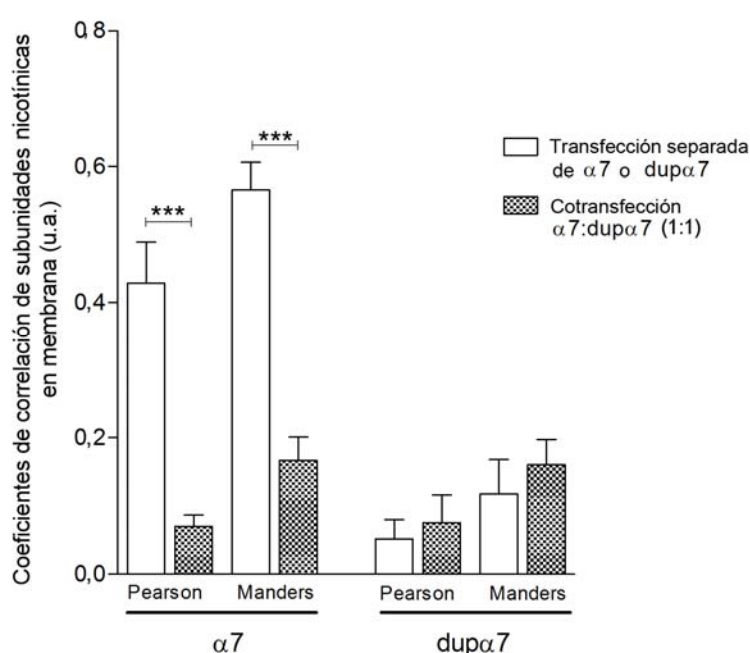


Figura 39: Cuantificación de los sitios de colocación de subunidades en la membrana citosólica de células GH4C1. Las células fueron transfectadas con las construcciones $\alpha 7$ -Cherry y $\text{dup}\alpha 7$ -GFP de forma separada o combinada. Los valores representan la media \pm E.E.M. de los coeficientes de correlación obtenidos en células transfectadas con $\alpha 7$ -Cherry ($n = 7$) o $\text{dup}\alpha 7$ -GFP ($n = 5$), o con la combinación $\alpha 7$ -Cherry/ $\text{dup}\alpha 7$ -GFP ($n = 11$). El análisis se realizó con el programa JACoP del software Image J. *** $p < 0,001$ tras comparar los valores indicados.

A la vista de los anteriores resultados que mostraban como la coexpresión de $\text{dup}\alpha 7$ reducía la expresión en membrana del $\alpha 7$ -AChR, se procedió a descartar que este efecto fuese debido a una interferencia con la traducción del $\alpha 7$ ARNm a su correspondiente proteína por parte de $\text{dup}\alpha 7$. Para ello, se realizó el inmunoblot de los extractos proteicos obtenidos a partir de células transfectadas solo con $\alpha 7$ -Cherry, o con distintas proporciones de $\alpha 7$ -Cherry: $\text{dup}\alpha 7$ -GFP (1:1 o 1:2; manteniendo constante la

cantidad de $\alpha 7$ -Cherry transfectada mientras se incrementaba el dup $\alpha 7$ -GFP). La figura 40 muestra un inmunoblot representativo ($n = 3$) donde se observa como la coexpresión de dup $\alpha 7$ -Cherry, en cualquiera de las proporciones utilizadas, no modificaba la cantidad de proteína $\alpha 7$ -Cherry contenida en el extracto celular.

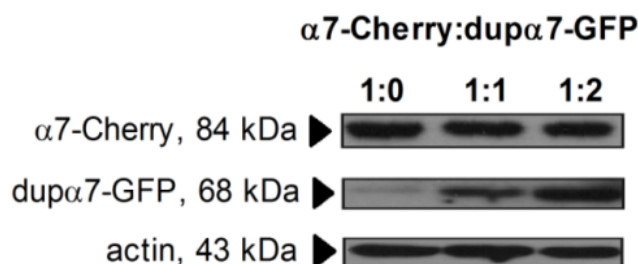


Figura 40: Inmunoblot analizando la expresión de subunidades nicotínicas en células GH4C1 transfectadas con distintas proporciones de $\alpha 7$ -Cherry y dup $\alpha 7$ -GFP. La expresión de ambas subunidades en cada extracto proteico fue detectada con los anticuerpos anti-Cherry y anti-GFP. Como control de carga proteica se utilizó el anticuerpo anti- β -actina.

1.2 Interacción física de subunidades $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ en células GH4C1.

La posibilidad de que dup $\alpha 7$ estuviera interfiriendo con la actividad del $\alpha 7$ -nAChR a través de la interacción física con la subunidad $\alpha 7$ y la consiguiente formación de nAChRs mixtos dup $\alpha 7/\alpha 7$, fue evaluada en células GH4C1 mediante la técnica de FRET. Las células fueron transfectadas con dos parejas de construcciones $\alpha 7$ -GFP:dup $\alpha 7$ -Cherry y dup $\alpha 7$ -GFP: $\alpha 7$ -Cherry, en las proporciones 1:0,5 o 1:1, siguiendo el procedimiento indicado en la correspondiente sección de *Materiales y Métodos*. La figura 41A muestra los resultados de FRET en una célula transfectada con la primera pareja ($\alpha 7$ -GFP:dup $\alpha 7$ -Cherry; proporción 1:1). Se observa como tras el fotoblanqueo del área enmarcada se produce un aumento de la fluorescencia de $\alpha 7$ -GFP (post) con respecto a la fluorescencia de $\alpha 7$ -GFP (pre) captada antes de la destrucción de la molécula aceptora dup $\alpha 7$ -Cherry. Los valores medios \pm E.E.M. de eficiencia de FRET obtenidos en células transfectadas con la pareja de construcciones $\alpha 7$ -GFP:dup $\alpha 7$ -Cherry, en las proporciones de 1:0,5 o 1:1, fueron $11,9 \pm 2,6$ y $21,7 \pm 3,2$, respectivamente (Fig. 41B). La misma figura también muestra que las células transfectadas con la pareja de construcciones en la

que el dup α 7 actúa como donador (dup α 7-GFP: α 7-Cherry), especialmente para la proporción 1:1, arroja valores de eficiencia de FRET significativamente más altos ($41,8 \pm 2,5$ %) que los obtenidos con la anterior pareja. Es interesante resaltar que la eficiencia del FRET se incrementa significativamente en las dos parejas de construcciones conforme aumenta la cantidad transfectada de la construcción que contiene la molécula aceptora (Cherry).

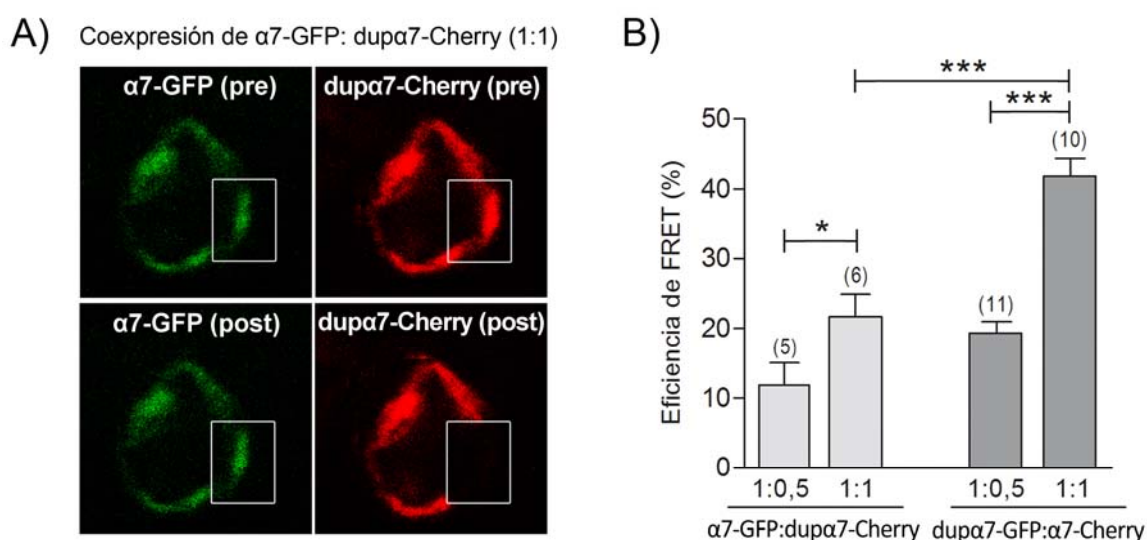


Figura 41: Evaluación de la interacción física entre subunidades α 7 y dup α 7 en células GH4C1 mediante FRET. Las células fueron transfectadas con las parejas de construcciones α 7-GFP:dup α 7-Cherry o dup α 7-GFP: α 7-Cherry, en las proporciones indicadas. A) Imágenes de microscopía confocal representativas del análisis de FRET en una célula cotransfectada con la pareja α 7-GFP:dup α 7-Cherry (1:1) donde se muestra la fluorescencia emitida por el α 7-GFP en la zona enmarcada, antes (pre) y después (post) del fotoblanqueo de dup α 7-Cherry; el análisis de eficiencia de FRET se realizó en la zona seleccionada. B) Los valores de eficiencia de FRET (expresados en porcentaje) representan la media \pm E.E.M. del número de células analizadas (en paréntesis); * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$, tras comparar los valores indicados.

1.3 Interacción física de subunidades α 7 y dup α 7 en células RAW 264.7.

Una vez constatada la interacción física entre las subunidades α 7 y dup α 7 en un tipo celular de naturaleza neuroendocrina, pasamos a analizar si la anterior interacción también se producía en células inmunes, como serían las de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7. Estas últimas células se caracterizan por expresar endógenamente un α 7-nAChR funcional pero, al no ser células humanas, carecen de la subunidad dup α 7. De esta forma, las células RAW 264.7 constituyen un modelo, a medio camino, entre las células GH4C1 (que no expresan endógenamente ninguna de las dos subunidades nicotínicas) y las SH-SY5Y (que si expresan ambas y que serán evaluadas

más adelante en esta tesis).

Se realizó nuevamente el análisis de FRET para evaluar si se producía interacción física entre las subunidades $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ en células RAW 264.7 nucleofectadas con las dos parejas de construcciones $\alpha 7$ -GFP:dup $\alpha 7$ -Cherry o dup $\alpha 7$ -GFP: $\alpha 7$ -Cherry, en las proporciones 1:0,5 y 1:1. La figura 42A muestra imágenes confocales representativas del análisis realizado en una célula nucleofectada con la pareja dup $\alpha 7$ -GFP: $\alpha 7$ -Cherry (1:1) donde se puede observar el incremento de fluorescencia del donador (dup $\alpha 7$ -GFP, post) tras el fotoblanqueo del aceptor ($\alpha 7$ -Cherry, post). La imagen en pseudocolor a la derecha indica la eficiencia de FRET de acuerdo a la escala de colores adyacente. La figura 42B muestra los valores medios \pm E.E.M de eficiencia de FRET, expresados como porcentaje, obtenidos en varias células nucleofectadas con las dos parejas de construcciones, tal como se ha indicado anteriormente. Nuevamente, se observa que nucleofección de la pareja de construcciones en la que el dup $\alpha 7$ actúa como donador (dup $\alpha 7$ -GFP: $\alpha 7$ -Cherry) proporciona niveles de eficiencia de FRET significativamente más altos que los encontrados cuando es la otra pareja la que se nucleofecta. También, en células RAW 264.7, se reproduce el hallazgo encontrado anteriormente en células GH4C1 de que la eficiencia del FRET se incrementa significativamente en las dos parejas de construcciones conforme aumenta la cantidad transfectada de la construcción que contiene la molécula aceptora (Cherry).

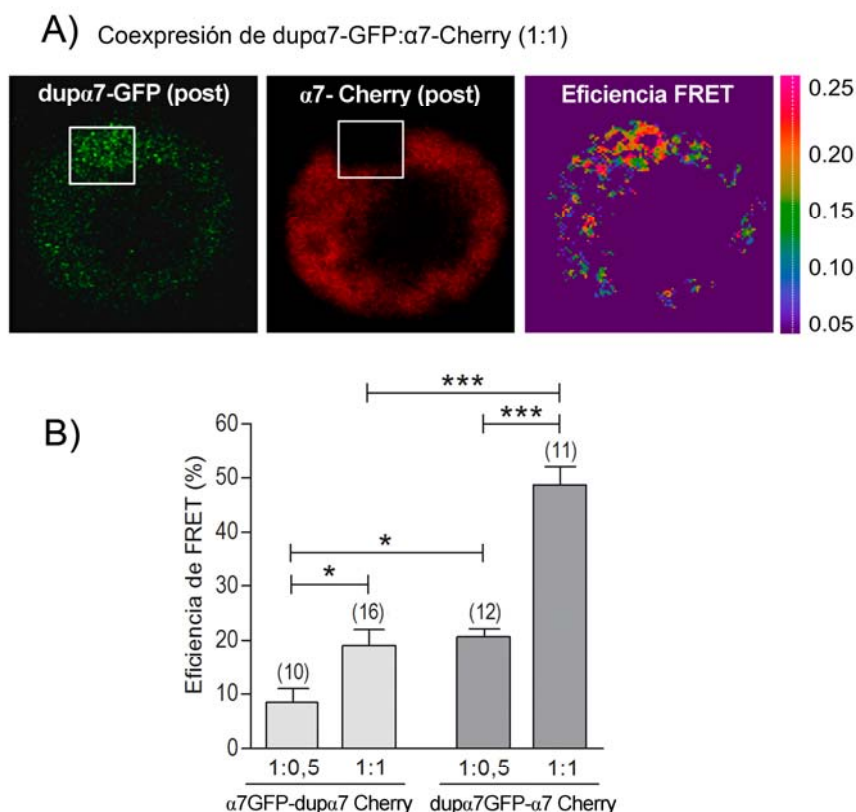


Figura 42: Evaluación de la interacción física entre subunidades α 7 y dup α 7 en células RAW264.7 mediante FRET. Las células fueron nucleofectadas con las parejas de construcciones α 7-GFP:dup α 7-Cherry o dup α 7-GFP: α 7-Cherry, en las proporciones indicadas. A) Imágenes de microscopía confocal representativas del análisis de FRET en una célula nucleofectada con la pareja dup α 7-GFP: α 7-Cherry (1:1) donde se aprecia el incremento de la fluorescencia emitida por dup α 7-GFP (post) en la zona enmarcada después del fotoblanqueo de α 7-Cherry (post). La imagen en pseudocolor (derecha) muestra la eficiencia de FRET en la zona seleccionada de acuerdo con la escala de colores adyacente. B) Los valores de eficiencia de FRET (expresados en porcentaje) representan la media \pm E.E.M. del número de células analizadas (en paréntesis); * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$, tras comparar los valores indicados.

1.4 Interacción física de subunidades α 7 y dup α 7 en células SH-SY5Y.

El tercer tipo celular seleccionado para el análisis de la interacción física entre ambas subunidades nicotínicas correspondió al de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Esta línea celular se diferencia de las dos anteriores en que expresa endógenamente tanto α 7-nAChRs funcionales como la subunidad dup α 7, aunque el papel funcional de esta última permanece sin explorar.

Dado que los valores más altos de eficiencia de FRET en células GH4C1 y RAW264.7 se obtuvieron cuando se realizaba la transfección de las parejas de construcciones α 7-GFP: dup α 7-Cherry y dup α 7-GFP: α 7-Cherry en la proporción 1:1, ésta última fue la elegida para transfectar las anteriores parejas de construcciones en

células SH-SY5Y. La figura 43A muestra imágenes confocales representativas del ensayo de FRET en una célula transfectada con dup α 7-GFP: α 7-Cherry; las imágenes fueron captadas antes (pre) y después (post) del fotoblanqueo del aceptor (Cherry). La figura 43B muestra los valores medios \pm E.E.M de eficiencia de FRET (expresados en porcentaje) en varias células transfectadas con una u otra pareja de construcciones. Como ocurría con los anteriores tipos celulares, la eficiencia de FRET en células RAW264.7 fue significativamente superior para la pareja de construcciones transfectadas en la que dup α 7 era el donador (dup α 7-GFP: α 7-Cherry).

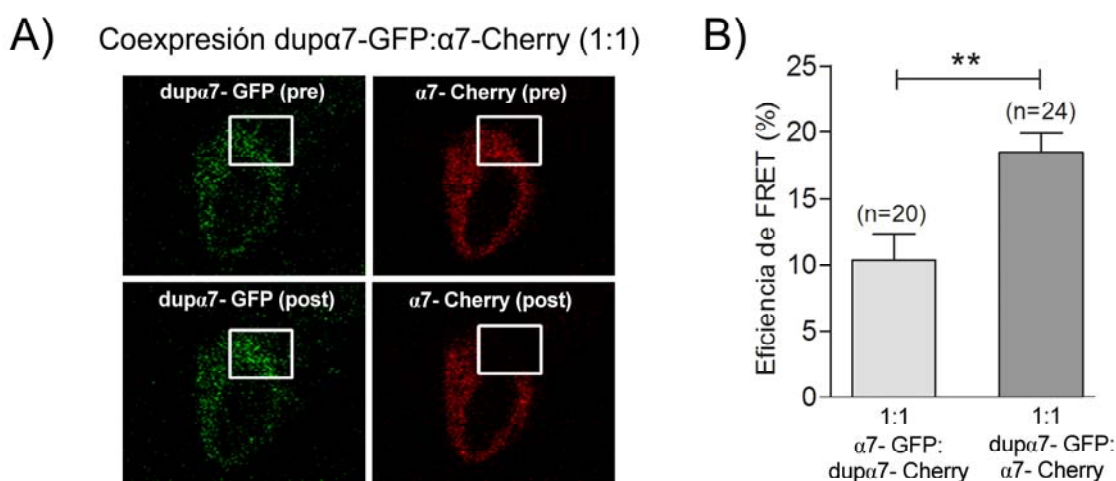


Figura 43: Evaluación de la interacción física entre subunidades α 7 y dup α 7 en células SH-SY5Y mediante FRET. Las células fueron transfectadas con las parejas de construcciones α 7-GFP:dup α 7-Cherry o dup α 7-GFP: α 7-Cherry, en la proporción indicada. A) Imágenes de microscopía confocal representativas del análisis de FRET en una célula cotransfectada con la pareja de construcciones dup α 7-GFP: α 7-Cherry, donde se muestra la fluorescencia emitida por el dup α 7-GFP en la zona enmarcada, antes (pre) y después (post) del fotoblanqueo de α 7-Cherry; el análisis de eficiencia de FRET se realizó en la zona seleccionada. B) Los valores de eficiencia de FRET (expresados en porcentaje) representan la media \pm E.E.M. del número de células analizadas (en paréntesis); ** p < 0,01 tras comparar los valores indicados.

Los resultados de eficiencia de FRET, obtenidos en células GH4C1, RAW 264.7 y SH-SY5Y, confirman que las subunidades α 7 y dup α 7 interaccionan físicamente entre sí en los tres tipos celulares analizados en este estudio, si bien la eficiencia del FRET depende del tipo celular, siendo progresivamente decreciente para RAW 264.7 > GH4C1 > SH-SY5Y.

1.5 La subunidad dup α 7 forma receptores mixtos con la subunidad α 7 (α 7dup α 7-nAChR) en células RAW 264.7 en detrimento de la expresión en membrana de α 7-nAChR homoméricos funcionales.

Una vez probada que la interacción física de dup α 7 con la subunidad α 7 se produce en células RAW 264.7, nos planteamos explorar si dicha interacción conlleva a la formación de un receptor mixto (α 7dup α 7-nAChR) en este tipo celular. Este receptor mixto, probablemente, accedería con dificultad a la membrana celular disminuyendo la expresión en la misma de α 7-nAChRs homoméricos funcionales de nueva síntesis. Para evaluar esta hipótesis, marcamos los α 7-nAChRs homoméricos, expresados endógenamente en la membrana plasmática de este tipo celular, con la toxina selectiva para este subtipo de receptor (α -BGtx conjugada con Alexa 488) analizando la intensidad de la fluorescencia por citometría de flujo en células no transfectadas (controles) o nucleofectadas con 1 μ g-2 μ g de las construcciones dup α 7.pcDNA3.1/myc-his, dup α 7-pmCherry-N1 o con los correspondientes vectores vacíos (pcDNA3.1/myc-his y pmCherry-N1). La intensidad de fluorescencia fue monitorizada mediante citometría de flujo.

La figura 44A muestra los resultados de un experimento de citometría representativo (n = 3) realizado en células RAW264.7, controles o nucleofectadas con 1 μ g de las distintas construcciones, tras su marcaje con α -Bgtx-Alexa 488. En el eje de abscisas se representa la intensidad de fluorescencia de la toxina ligada al fluoróforo (canal FL1) indicativa del nivel de expresión de α 7-nAChRs funcionales en la membrana celular. El eje de ordenadas refleja el parámetro de complejidad celular (SSC, *del inglés Side Scatter*), el cual muestra la homogeneidad de la población celular analizada. Los 4 diagramas de contorno representan la fluorescencia correspondiente a los α 7-nAChRs funcionales expresados en membrana en el total de células del cultivo (positivas para α -Bgtx-Alexa 488, panel superior izquierdo), en la subpoblación celular marcada con el anticuerpo anti-myc (positivas para dup α 7-myc y α -Bgtx-Alexa 488, panel superior derecho), en la subpoblación celular que expresa dup α 7-Cherry (positivas para dup α 7-Cherry y α -Bgtx-Alexa 488, panel inferior derecho), y en la subpoblación que expresa el vector mCherry vacío (positivas para Cherry-N1 y α -Bgtx-Alexa 488, panel inferior izquierdo). La figura 44B representa la media \pm E.E.M. de intensidad de fluorescencia correspondiente al marcaje con α -Bgtx-Alexa 488 (α 7-nAChRs funcionales) en células

sometidas a las condiciones experimentales descritas arriba pertenecientes a 3 cultivos distintos. Puede observarse como el número de $\alpha 7$ -nAChRs funcionales en las células no transfectadas, o en las nucleofectadas con los vectores vacíos, se reduce significativamente en la subpoblación que expresa dup $\alpha 7$ -myc o en aquella que expresa dup $\alpha 7$ -Cherry, a cualquiera de las concentraciones de las construcciones utilizadas para la nucleofección. Es interesante resaltar que nuestros resultados no permiten conocer la estructura celular en la que se localiza el dup $\alpha 7$ -Cherry expresado. Por el contrario, los datos anteriores si indican que la expresión dup $\alpha 7$ -myc, la cual ha sido utilizada para seleccionar la correspondiente subpoblación celular, está exclusivamente localizada en la membrana celular ya que la incubación con el anticuerpo anti-myc se realizó en las células no permeabilizadas, con lo que el anticuerpo solo puede unirse a la subunidad dup $\alpha 7$ incorporada a la membrana. Este último resultado, junto con la reducción del número de $\alpha 7$ -nAChR homoméricos en la misma subpoblación celular, sugiere la expresión de un dup $\alpha 7$ / $\alpha 7$ -nAChR mixto con capacidad para migrar a la membrana plasmática de la célula en detrimento de la incorporación a la membrana de $\alpha 7$ -nAChRs homoméricos funcionales.

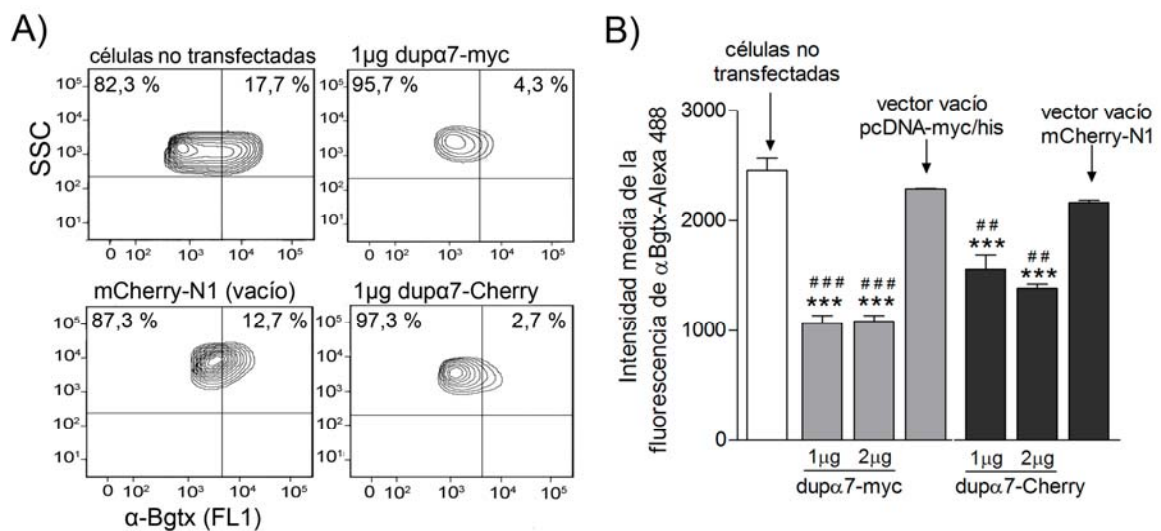


Figura 44: Niveles de expresión de $\alpha 7$ -nAChR funcionales en membrana de células RAW 264.7 medidos por citometría de flujo. Los $\alpha 7$ -nAChR homoméricos expresados en la membrana de las células, controles o nucleofectadas con distintas construcciones, fueron marcados con α -Bgtx-Alexa 488. A) Diagramas de contorno representativos de la intensidad de fluorescencia del canal verde (FL1) correspondiente a los $\alpha 7$ -nAChRs marcados con la toxina en cada subpoblación celular. B) Diagrama de barras mostrando la media \pm E.E.M. de los valores de fluorescencia obtenidos en las distintas subpoblaciones celulares pertenecientes a 3 cultivos independientes. *** $p < 0,001$ comparados con células no transfectadas. ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ comparados con los respectivos vectores vacíos.

2. REPERCUSIÓN FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN $\alpha 7$ /dup $\alpha 7$ A NIVEL DE LA NEUROTRANSMISIÓN.

2.1 Preparación y selección de células SH-SY5Y con sobreexpresión estable de dup $\alpha 7$ -myc.

Una vez constatada la interacción física entre las subunidades $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ en las tres líneas celulares de mamífero analizadas, así como la capacidad de dup $\alpha 7$ para reducir el tráfico e incorporación a la membrana de $\alpha 7$ -nAChRs homoméricos funcionales, pasamos a investigar si la anterior interacción tenía alguna implicación funcional. Para responder a esta cuestión se seleccionó la línea celular SH-SY5Y en base a las siguientes razones: 1) sus células constituyen un excelente modelo neuronal para estudiar señales de $[Ca^{2+}]_i$ y secreción mediadas por $\alpha 7$ -nAChRs; 2) estas células expresan endógenamente $\alpha 7$ -AChRs funcionales así como subunidades dup $\alpha 7$; y 3) son células humanas.

Los siguientes experimentos fueron diseñados para analizar si la sobreexpresión de dup $\alpha 7$ en células SH-SY5Y modificaba la señal de $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción inducidas por la activación del $\alpha 7$ -nAChR endógeno de las células. Para evitar que se produzcan diferencias de expresión de dup $\alpha 7$ entre cultivos transfectados transitoriamente con el plásmido, se decidió recurrir a la transfección estable de esta subunidad nicotínica mediante el uso de antibióticos de selección.

Las células fueron transfectadas con la construcción dup $\alpha 7$.pcDNA3.1/myc-his, o con su vector vacío pcDNA3.1/myc-his por dos procedimientos (lipofección o nucleofección), con objeto de identificar el método de transfección más eficiente. A la hora de seleccionar los clones para realizar el estudio funcional se tuvo en cuenta que éstos tuvieran una clara sobreexpresión de dup $\alpha 7$, sin que sus niveles de expresión de $\alpha 7$ se difirieran significativamente de los encontrados en las células no transfectadas. Tras seleccionar varios clones que sobrevivían en presencia del antibiótico de selección como posibles candidatos dup $\alpha 7$ -myc positivos, se evaluó si dichos clones realmente sobreexpresaban dup $\alpha 7$ -myc. Para ello se realizó el inmunomarcaje del epítipo con el anticuerpo anti-myc en células derivadas de cada clon, visualizando las imágenes por microscopía confocal. Mientras que la fluorescencia era inapreciable en células sin transfectar (control), las células de algunos de los clones seleccionados como posibles dup $\alpha 7$ -myc positivos, así como los clones que expresaban el vector vacío, mostraban una

nítida señal fluorescente (verde), la cual era indicativa de la expresión de dup α 7-myc o del vector vacío (c-myc) (Fig. 45). De las células lipofectadas se aislaron 9 clones candidatos, aunque solo dos de ellos (a los que denominamos L1 y L2) presentaron inmunomarcaje positivo para dup α 7-myc. Con respecto a las células nucleofectadas, se aislaron 15 posibles clones dup α 7-myc positivos supervivientes en el medio con el antibiótico, aunque tras el inmunomarcaje con anti-myc y la microscopía confocal, solo se pudo constatar la positividad frente a dup α 7-myc en 5 de ellos (denominados N1, N2, N3, N4 y N5). Estos resultados indican que el rendimiento de la transfección de dup α 7-myc es superior con la nucleofección que con la lipofección (33% *versus* 22%).

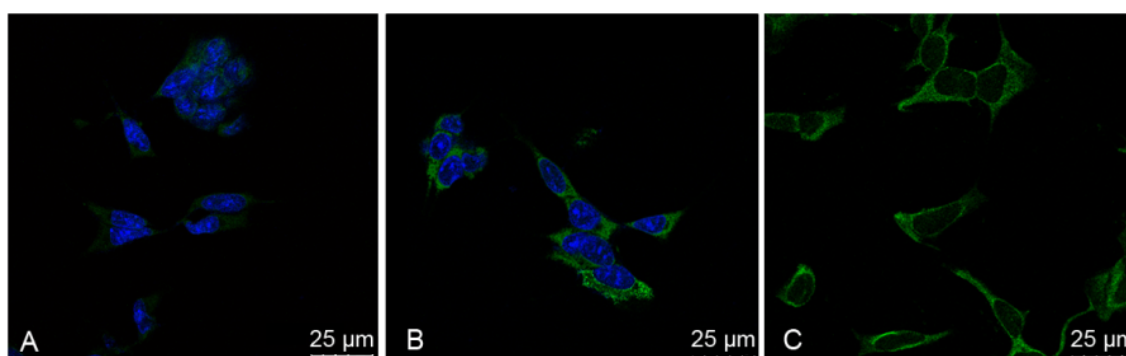


Figura 45: Células SH-SY5Y con expresión estable de dup α 7-myc tras el inmunomarcaje (verde) del epítipo c-myc. Imágenes confocales de células marcadas con el anticuerpo anti-myc. A) Células no transfectadas (controles) cuyo núcleo es marcado con DAPI (azul). B) Células del clon N1, procedente de la nucleofección de dup α 7.pcDNA3.1/myc-his, con sobreexpresión estable de dup α 7-myc; en azul los núcleos marcados con DAPI. C) Células transfectadas con el vector vacío pcDNA3.1/myc-his.

Una vez identificados y seleccionados los 7 clones que daban positivo para la sobreexpresión de dup α 7-myc, de acuerdo al resultado del inmunomarcaje anterior, se reevaluó dicha sobreexpresión a través de la medida del nivel de expresión del dup α 7 ARNm en cada clon por qPCR, utilizando cebadores específicos. También se determinó en paralelo, mediante qPCR y los cebadores apropiados, el nivel de expresión del α 7 ARNm en cada clon. Los resultados de expresión de ambos mensajeros en cada clon fueron normalizados respecto a la expresión encontrada en células sin transfectar (controles), ésta última considerada como la unidad (= 1). La figura 46 (paneles A-D) muestra la media \pm E.E.M de la expresión normalizada de los ARNms de dup α 7 y α 7 procedente de 3 determinaciones diferentes, realizadas por triplicado, en células controles y en los clones seleccionados con sobreexpresión de dup α 7. Se observa que todos los

clones derivados de la nucleofección muestran niveles de expresión de dup α 7 ARNm muy superiores a los de los clones derivados de la lipofección (paneles A y B). Incluso el clon N5, que es el que muestra la sobreexpresión de dup α 7 más baja de entre los clones obtenidos por nucleofección, alcanza un valor de 8 veces la expresión de las células control.

La expresión endógena del α 7 ARNm no difiere de forma tan drástica entre los clones obtenidos por una u otra técnica de transfección (paneles C y D). No obstante, se observa que algunos de los clones positivos seleccionados (L2, N2, N3, N4 y N5) presentan niveles de α 7 ARNm que difieren significativamente de los encontrados en células controles, por lo que estos últimos clones fueron descartados. Así, para continuar con el estudio se seleccionaron los clones L1 y N1 dado que, aunque ambos clones diferían notablemente en el nivel de expresión del dup α 7 ARNm, mostraban niveles de α 7 ARNm similares a los de las células control. Para analizar si una diferencia tan notable de expresión de dup α 7 ARNm entre los dos clones seleccionados se reproducía a nivel de la proteína se realizaron inmunoblots donde, utilizando el anticuerpo anti-myc, se pudo constatar que el grado de sobreexpresión de la subunidad dup α 7 era muy parecido en ambos clones (Fig. 46E). Los resultados anteriores nos garantizan el poder utilizar ambos clones, indistintamente, para estudiar el efecto de la sobreexpresión de dup α 7 sobre la actividad funcional del α 7-nAChR en células SH-SY5Y. Los siguientes experimentos, realizados con los dos clones seleccionados junto con células controles, nos permitieron abordar la actividad funcional del α 7-nAChR a través del registro de la señal de $[C^{2+}]_i$ y la secreción de neurotransmisores inducida por la activación del receptor en poblaciones celulares o en célula única.

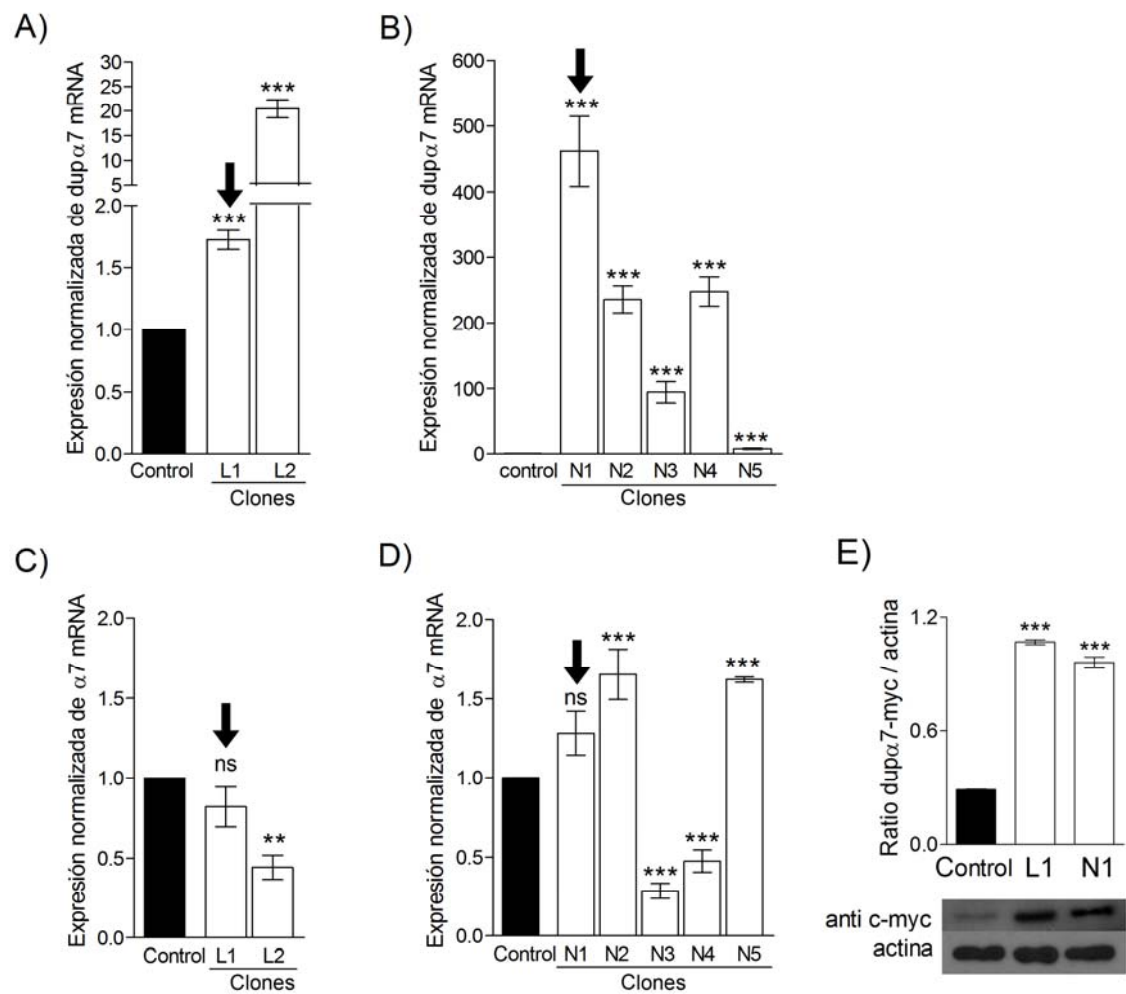


Figura 46: Niveles de expresión de dupα7 foráneo y de α7 endógeno en células SH-SY5Y controles o con sobreexpresión estable de dupα7-myc (clones). A-D) Expresión normalizada de los ARNs de ambas subunidades nicotínicas determinada por qPCR en células controles (valor = 1) y en los clones obtenidos tras lipofección (L1 y L2) o nucleofección (N1-N5). Los valores representan la media ± E.E.M. de 3 cultivos independientes; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ tras comparar con el control. E) Expresión de la proteína dupα7-myc, determinada por inmunoblot con el anticuerpo anti-myc, en células controles o en los dos clones (L1 y N1) con expresión estable de dupα7-myc seleccionados para el posterior estudio funcional (flecha negra). En la parte inferior aparece un inmunoblot típico; en la superior los valores medios ± E.E.M. de expresión de dupα7-myc referida a la de actina en 3 cultivos distintos; *** $p < 0,001$ comparando con el control

2.2 Efecto de la sobreexpresión de dup α 7 sobre la señal de $[Ca^{2+}]_i$ mediada por el α 7-nAChR en poblaciones de células SH-SY5Y.

La neurotransmisión es un proceso complejo acoplado a la entrada de Ca^{2+} al citosol y el consiguiente incremento de la señal de $[Ca^{2+}]_i$. Este último incremento activa la liberación del neurotransmisor por un mecanismo exocitótico resultante de la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática. Por tanto, el registro de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ en neuronas en respuesta a un determinado estímulo es un buen indicador de la capacidad de dicho estímulo para producir una respuesta secretora en la célula.

Los experimentos que se diseñaron a continuación consistieron en evaluar la capacidad de la subunidad dup α 7 para interferir con la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la estimulación del α 7-nAChR en una población de células SH-SY5Y. Para ello se utilizaron tres poblaciones celulares distintas, las correspondientes a células no transfectadas (controles) o aquellas que sobreexpresan establemente dup α 7 (clones L1 y N1). Para estimular selectivamente el α 7-nAChR se utilizó el PNU 282987, un agonista con alta afinidad y selectividad para este subtipo de receptor (Hajos y col. 2005). En base a su selectividad por el α 7-nAChR, el PNU 282987 podría mejorar los déficits de atención y la memoria, por lo que ha sido propuesto que el fármaco podría tener utilidad terapéutica en la enfermedad de Alzheimer (Vicens y col. 2013) y en la esquizofrenia (Hajos y col. 2005).

El diseño de estos experimentos consistió en, una vez cargadas las células con la sonda fluorescente Fluo 4-AM, someterlas a la estimulación de concentraciones crecientes de PNU 282987 (rango 1nM -10 μ M); el estímulo fue aplicado en forma de pulso (1s) utilizando un inyector controlado por el propio sistema del lector de placas. La figura 47 muestra la curva concentración-respuesta de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por PNU 282987 en células SH-SY5Y. Se observa como la intensidad de la señal es dependiente de la concentración del agonista hasta alcanzar un ‘plateau’ a la concentración de 0,3 μ M del agonista. También se aprecia que la intensidad de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ era muy baja para todas las concentraciones de PNU 282987 ensayadas, lo cual podría dificultar la posterior evaluación de un posible efecto de dup α 7 sobre dicha señal. Para solventar esta limitación, se procedió a reproducir el anterior experimento pero, esta vez, preincubando las células con un modulador alostérico positivo (MAP) del α 7-nAChR, como es el PNU 120596, el cual deberá potenciar la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el agonista (Hurst y col. 2005; Gronlien y col. 2007). Los resultados de la figura 47

muestran que este es el caso; así, la preincubación de las células con 0,5 μM de PNU 120596, 10 min antes de inyectar el estímulo y a lo largo de todo el periodo de estimulación, potenció significativamente la respuesta al agonista a casi todas las concentraciones ensayadas, con excepción de las inferiores a 10 nM. En base a estos resultados, se incorporó sistemáticamente el MAP en los experimentos posteriores, realizados con los clones L1 y N1, en los que se analizó la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por la activación del $\alpha 7$ -nAChR con PNU 282987.

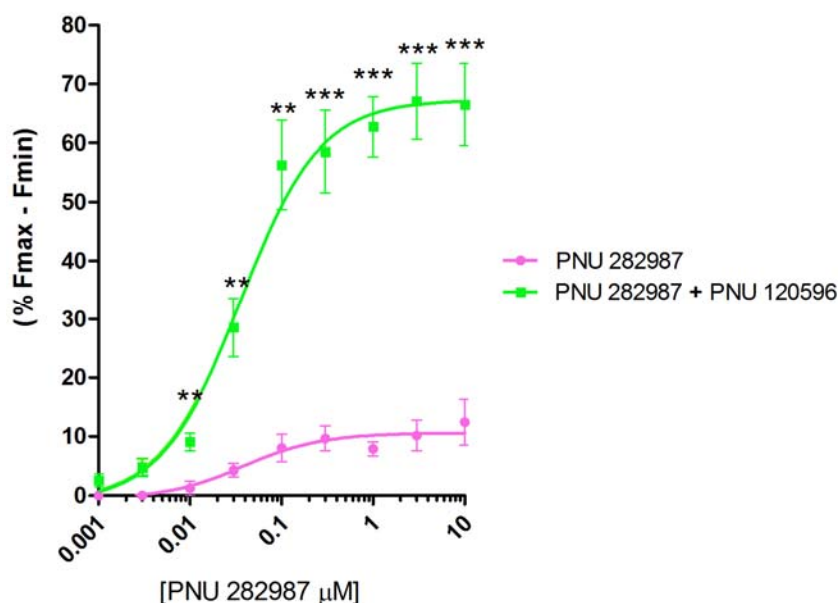


Figura 47: El modulador alostérico positivo del $\alpha 7$ -nAChR potencia la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por la activación del receptor en células SH-SY5Y controles. Para inducir la señal, las células fueron estimuladas con concentraciones crecientes (rango 1 nM - 10 μM) de PNU 282987, un agonista específico del $\alpha 7$ -nAChR. La concentración de PNU 120596, modulador alostérico positivo (MAP) del mismo subtipo de receptor, fue de 0,5 μM . Los datos son expresados como porcentaje de Fmax-Fmin (media \pm E.E.M.) de la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el agonista, en ausencia o presencia del MAP, en 4 cultivos diferentes; los valores de cada cultivo se obtuvieron por triplicado. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ tras comparar los valores correspondientes a la misma concentración del agonista en ambas curvas.

La figura 48 muestran los trazados originales de unidades de fluorescencia arbitrarias (u.a.) de la sonda Fluo 4-AM reflejando el incremento de la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por concentraciones crecientes de PNU 282987, en presencia del MAP, en células controles (panel A) y en células del clon N1 (panel B). El panel C de la misma figura muestra la media \pm E.E.M. de la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por el agonista, expresada como porcentaje, en varios cultivos independientes realizados en células controles, en los clones L1 y N1, así como en células con sobreexpresión estable del vector

vacío. Se observa como la sobreexpresión de $\text{dup}\alpha 7$ (clones L1 y N1) reduce, de manera significativa, la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por casi todas las concentraciones de PNU 282987, a excepción de las más bajas. No se encontraron diferencias significativas entre los dos clones en lo que respecta al anterior efecto. Tampoco las células con expresión estable del vector vacío diferían significativamente de las células controles en su capacidad de respuesta al PNU 282987.

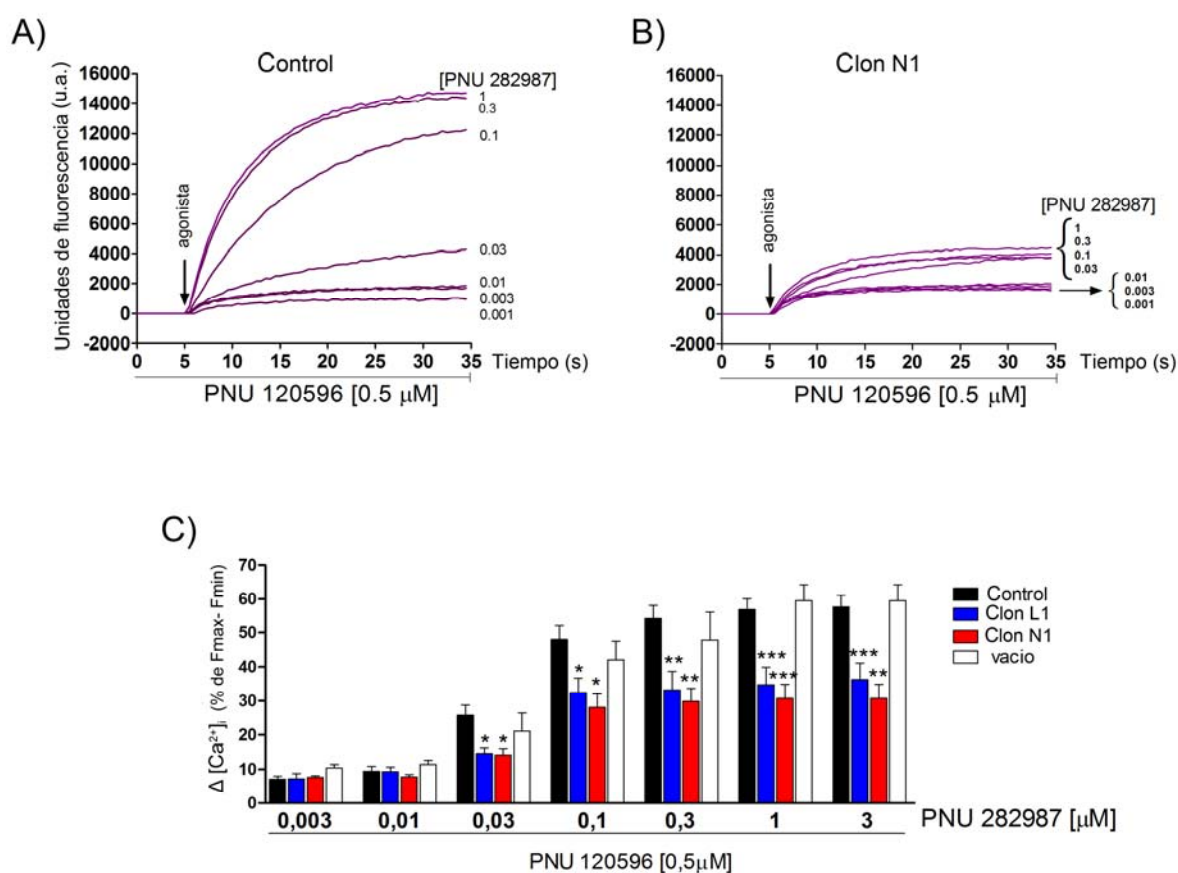


Figura 48: La sobreexpresión de $\text{dup}\alpha 7$ reduce la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediada por el $\alpha 7$ -nAChR en células SH-SY5Y. A y B) Trazados originales de intensidad de fluorescencia [expresada como unidades de fluorescencia arbitrarias (u.a.) de Fluo 4-AM] inducida por concentraciones crecientes de PNU 282987 (+ MAP) en una población de células control o de células del clon N1 (B). Los registros fluorimétricos realizados en las células, cargadas previamente con Fluo 4-AM, fueron monitorizados durante 35 s. La inyección automática del agonista PNU 282987 (flecha) se realizó a los 5 s de iniciar el registro, considerando como fluorescencia basal la registrada durante los segundos previos a la inyección. Para obtener el incremento neto de fluorescencia en respuesta a un determinado estímulo se sustrajo el valor basal del valor máximo de U.F.R. inducido por el agonista. C) Diagrama de barras mostrando la media \pm E.E.M. de la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por el agonista, expresada como porcentaje, en 4 cultivos independientes realizados en poblaciones de células controles, clones L1 y N1, así como de células con sobreexpresión estable del vector vacío. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ tras comparar con células controles o células que sobreexpresan el vector vacío.

Con los datos obtenidos anteriormente relativos al incremento (Δ) de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por concentraciones crecientes de PNU 282987, construimos dos tipos de curvas concentración-respuesta en las 4 poblaciones celulares analizadas (Fig. 49). Para confeccionar la primera curva (Fig. 49A), el valor del $\Delta [Ca^{2+}]_i$ en respuesta a cada concentración del agonista, en cada población celular, fue normalizado respecto a la máxima respuesta alcanzada en la población control (considerada el 100 %; obtenida con 3 μ M de PNU 282987). Mientras que las curvas concentración-respuesta de PNU 282987 en células controles o con sobreexpresión del vector vacío no difieren entre sí, se observa una significativa y similar reducción de la respuesta máxima obtenida por el agonista del $\alpha 7$ -nAChR en los dos clones que sobreexpresan dup $\alpha 7$. La menor eficacia de PNU 282987 para inducir $\Delta [Ca^{2+}]_i$ en los clones L1 y N1 no es resultado de un deterioro de la capacidad de respuesta de estos clones respecto a los otros dos tipos celulares, ya que los cuatro tipos de células responden con un $\Delta [Ca^{2+}]_i$ similar ante un estímulo despolarizante de alto K^+ (75 mM), aplicado como un pulso breve (1s) al finalizar el experimento.

Con objeto de excluir que el anterior efecto de dup $\alpha 7$, disminuyendo la eficacia de PNU 282987 para inducir un $\Delta [Ca^{2+}]_i$ mediado por el $\alpha 7$ -nAChR, fuese debido a un cambio de afinidad del fármaco por el receptor, se procedió a determinar los valores de las concentraciones efectivas de PNU 282987 que producían el 50 % del efecto máximo (EC_{50}) en las cuatro poblaciones celulares. Estos valores EC_{50} s reflejan la afinidad del fármaco por el $\alpha 7$ -nAChR. Con este propósito, confeccionamos una segunda curva concentración-respuesta del agonista en la que el valor del $\Delta [Ca^{2+}]_i$ inducido por cada concentración de PNU 282987 en cada población celular fue normalizado respecto a la máxima respuesta alcanzada por el fármaco en dicha población (considerada el 100 %) (Fig. 49B). Esta misma figura también muestra los valores de las EC_{50} s de PNU 282987 obtenidos en las 4 poblaciones celulares; estos valores no diferían significativamente entre sí, lo que indica que la sobreexpresión de dup $\alpha 7$ no produce cambios de afinidad del agonista por el $\alpha 7$ -nAChR.

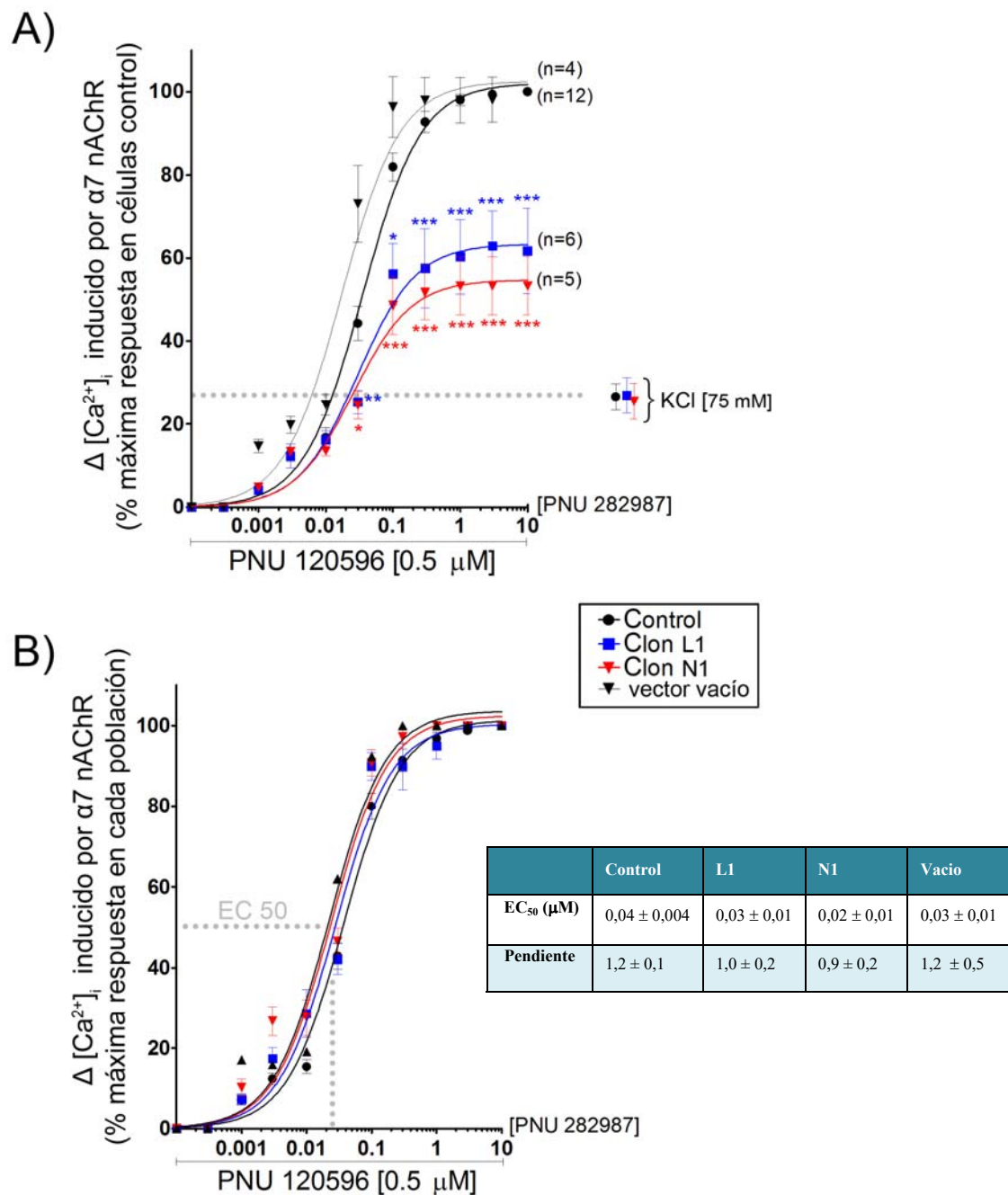


Figura 49: Respuesta normalizada de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la estimulación del $\alpha 7$ -nAChR en diferentes poblaciones celulares de SH-SY5Y. El incremento de la señal $\Delta [Ca^{2+}]_i$ inducido por la estimulación del receptor fue determinado en cuatro poblaciones celulares: control, con sobreexpresión estable de $\alpha 7$ (clones L1 y N1), o con sobreexpresión estable del vector vacío. La estimulación del $\alpha 7$ -nAChR se realizó con concentraciones crecientes del agonista PNU 282987 en presencia de PNU 120596, un MAP del receptor. A) Curvas concentración-respuesta mostrando el $\Delta [Ca^{2+}]_i$ inducido por el agonista en las 4 poblaciones celulares; cada valor fue normalizado respecto a la máxima respuesta obtenida en las células controles con 3 μ M de PNU 282987 (100 %). Tras un periodo de lavado, se aplicó un pulso despolarizante de alto K^+ para evaluar la capacidad de respuesta celular ante el nuevo estímulo al finalizar el experimento. B) Curvas concentración-respuesta mostrando el $\Delta [Ca^{2+}]_i$ inducido por el agonista en las 4 poblaciones celulares; cada valor fue normalizado respecto a la máxima respuesta (100 %) inducida por el agonista en la misma población celular. A la derecha, se recogen los valores de EC₅₀ de PNU 282987 y la pendiente de la curva determinados en cada población. Los datos representan la media \pm E.E.M del número de cultivos celulares indicados entre paréntesis para cada población. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, tras comparar con la población control.

2.3 Efecto de la sobreexpresión de dup α 7 sobre la señal de $[Ca^{2+}]_i$ mediada por el α 7-nAChR en célula SH-SY5Y única.

La disponibilidad de clones SH-SY5Y con sobreexpresión estable de dup α 7 nos permitió realizar experimentos en célula única, dado que todas las células crecidas a partir del clon original contenían el mismo nivel de expresión del dup α 7 ARNm y de la correspondiente proteína traducida. Con esta herramienta experimental, estábamos en condiciones de poder ratificar, en célula única, lo que previamente habíamos encontrado en poblaciones celulares.

En los experimentos de célula única, se utilizó la sonda radiométrica Fura2-AM para registrar la señal de $[Ca^{2+}]_i$ mediada por el α 7-nAChR. El protocolo de estimulación consistió en la aplicación de un pulso de 1 min de PNU 282987 (1 μ M), seguido de un periodo de 2 min de lavado mediante la perfusión con solución KH para, finalmente, aplicar a la célula un pulso despolarizante con alto K^+ (100 mM) de 30 s. El PNU 120596 [1 μ M] fue añadido al medio que perfunde las células desde 20 min antes del pulso del agonista hasta la finalización del experimento. Las células que no presentaron respuesta al estímulo con alto K^+ fueron descartadas del posterior análisis.

La figura 50 muestra los registros originales del incremento de fluorescencia (ΔF_{Ratio}) inducido por la aplicación de dos pulsos sucesivos de PNU 282987 (+MAP) y alto K^+ a una célula control y a otra perteneciente al clon L1. Se observa como la señal mediada por el α 7-nAChR es muy inferior en la célula con sobreexpresión de dup α 7 que en la control, a pesar de que la capacidad de responder al estímulo despolarizante en la primera célula es incluso superior a la de la segunda, probablemente porque la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el PNU 282987 en la célula control no ha regresado aún al nivel basal cuando se aplica el pulso de alto K^+ .

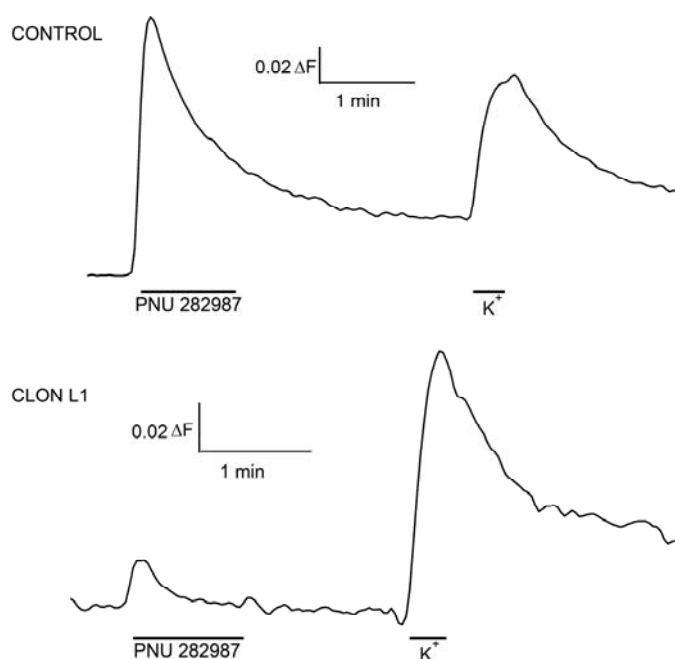


Figura 50: Registros originales del incremento de fluorescencia (ΔF_{Ratio}) inducido por el agonista del $\alpha 7$ -nAChR o por un estímulo despolarizante en células SH-SY5Y controles o con sobreexpresión de dup $\alpha 7$ (Clon L1). El PNU 282987 [1 μ M] fue utilizado para activar el $\alpha 7$ -nAChR; como estímulo despolarizante se utilizó una concentración de alto K⁺ (100 mM) ajustada osmóticamente.

En el panel A de la figura 51 se recoge el curso temporal del incremento de fluorescencia (ΔF) normalizado, tras la sustracción de F_0 (fluorescencia basal), correspondientes a 3 células de cada grupo (células control, clon L1 y clon N1) estimuladas con PNU 282987 (+ MAP). Los paneles B y C de la misma figura recogen, respectivamente, el ΔF_{Ratio} y la integral del área bajo la curva de ΔF inducidos por los dos estímulos (agonista nicotínico y alto K⁺) en los 3 grupos de células. Todos los valores, expresados como unidades arbitrarias (u.a.), representan la media \pm E.E.M de las células analizadas. De nuevo se observa como la sobreexpresión de dup $\alpha 7$ reduce significativamente casi todos los parámetros analizados relativos a la respuesta a PNU 282987, pero deja inalterados los correspondientes a la señal inducida por el estímulo despolarizante.

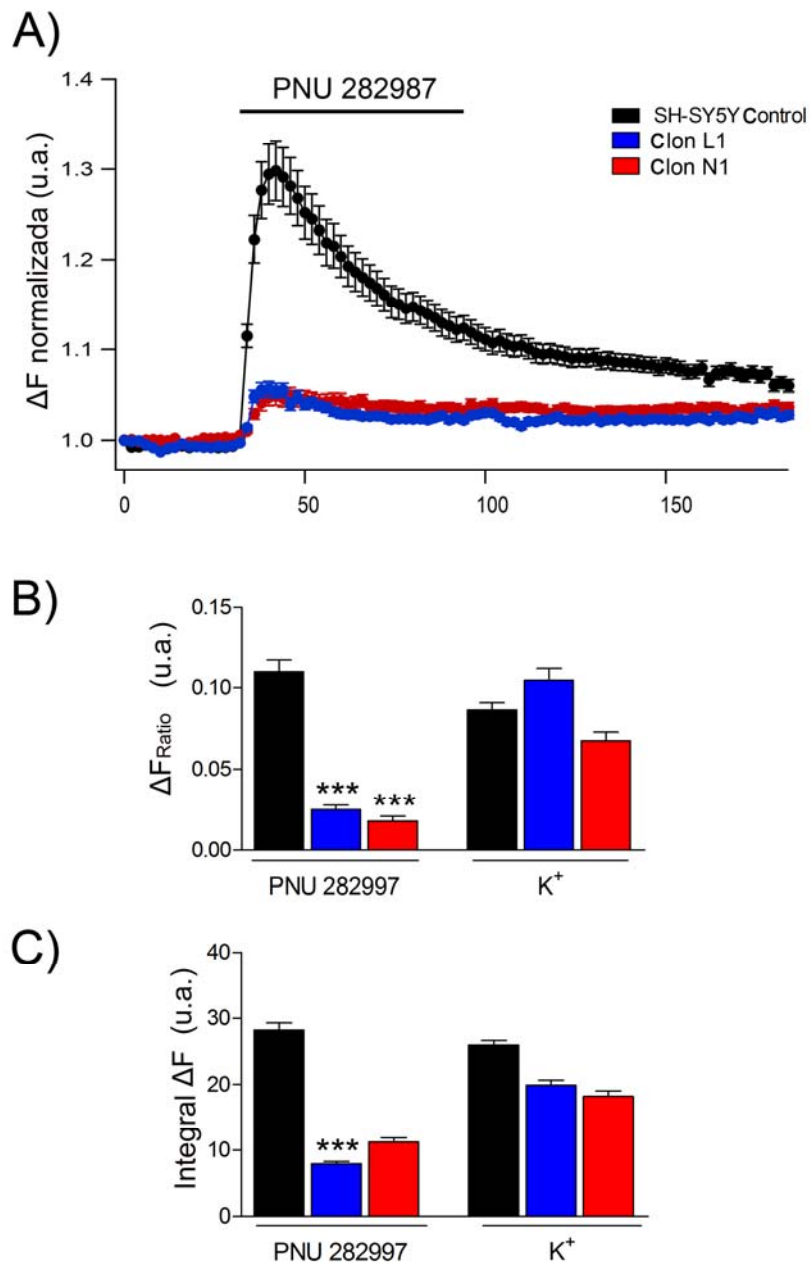


Figura 51: Análisis de distintos parámetros cinéticos relativos al incremento d fluorescencia (ΔF) generado por PNU 282987 y alto K^+ en célula única. A) Registro del curso temporal del ΔF normalizado en respuesta a la aplicación de PNU 282987 (1 μM) en los 3 tipos celulares. Cada registro corresponde con 3 células de cada grupo. B y C) ΔF_{Ratio} e Integral ΔF inducidas por la estimulación del $\alpha 7$ -nAChR con el agonista específico o por la depolarización celular con alto K^+ (100 mM) en los 3 grupos de células. Los datos son media \pm E.E.M. del total de células analizadas para cada grupo. *** $p < 0,001$ respecto a células control.

La tabla 16 recoge el análisis comparativo (ANOVA) de distintos parámetros cinéticos relativos a la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por los anteriores estímulos en un número mayor de células únicas (94 del grupo control, 57 pertenecientes al clon L1 y 33 al clon N1). Así, junto al valor del ΔF_{Ratio} y la integral del área bajo la curva, expresadas ambas en u.a., se determinó el tiempo que tarda la señal en alcanzar el pico máximo (tiempo al pico), así como la velocidad de caída de la señal desde el pico hasta valores basales (τ), expresados ambos en segundos.

Tabla 16: Parámetros farmacocinéticos de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida PNU 282987 y alto K^+ en célula única.

		ΔF_{Ratio} (u.a)	Integral (u.a)	Tiempo al pico (s)	τ de caída (s)
PNU 282987 [1 μ M]	Control	$0,11 \pm 0,01$	$28,1 \pm 1,1$	$11,5 \pm 0,3$	33 ± 2
	Clon L1	$0,03 \pm 0,003$ ***	$7,9 \pm 0,3$ ***	$12,9 \pm 0,7$	24 ± 2
	Clon N1	$0,02 \pm 0,003$ ***	$11,2 \pm 0,7$	$14,7 \pm 1,1$	25 ± 7 **
K^+ [100 mM]	Control	$0,09 \pm 0,004$	$25,2 \pm 0,6$	$24,3 \pm 0,5$	38 ± 1
	Clon L1	$0,11 \pm 0,01$	$19,9 \pm 0,7$	$21,3 \pm 0,4$	41 ± 2
	Clon N1	$0,07 \pm 0,01$	$18,2 \pm 0,8$	$21,2 \pm 0,7$	49 ± 7

Los datos son media \pm E.E.M de varias células pertenecientes a distintos cultivos; *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,05$ respecto a células controles.

Los resultados indican que los valores de ΔF_{Ratio} , integral del área bajo la curva y τ de la respuesta inducida por PNU 282987 son significativamente más bajos en las células de los dos clones que en células controles. No se encontraron diferencias significativas entre los clones y las células controles en relación al tiempo al pico de la respuesta mediada por PNU 282987, ni tampoco en relación a ninguno de los parámetros cinéticos de la respuesta inducida por alto K^+ . En conjunto, todos los anteriores resultados parecen indicar que la sobreexpresión de $\text{dup}\alpha 7$ solo está afectando al $\alpha 7$ -nAChR y, consecuentemente, a la señal de $[Ca^{2+}]_i$ generada por la estimulación de este receptor. Sin embargo, dicha sobreexpresión no modifica ninguna otra vía de entrada de Ca^{2+} a la célula (p. e., CCVD), ni tampoco la capacidad de respuesta celular a cualquier estímulo cuyo efecto sea independiente del anterior subtipo de receptor.

Dada la variabilidad de respuestas inducidas por PNU 282987 en el conjunto de células individuales estudiadas, se normalizó el valor de amplitud del $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el agonista nicotínico en cada célula respecto al valor obtenido con alto K^+ en la misma célula, al que se le asignó un valor del 100 %. Con esta nueva representación se constata, una vez más y más rotundamente que con las representaciones anteriores, el bloqueo significativo de la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la activación selectiva del $\alpha 7$ -nAChR tras la sobreexpresión de dup $\alpha 7$. Así, mientras que el $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ normalizado inducido por PNU 282987 en células controles alcanzó un valor de 157 ± 17 % respecto al producido por el alto K^+ (100 %), las células con sobreexpresión de dup $\alpha 7$ (clones L1 y N1) solo respondieron con un $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ del 25 ± 2 % y 36 ± 5 %, respectivamente (Fig. 52).

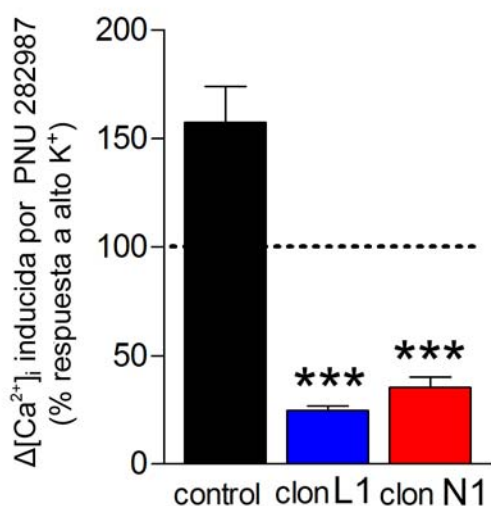


Figura 52: ΔCa^{2+} inducido por PNU 282987, expresado como porcentaje del obtenido por alto K^+ en la misma célula (100 %). Los valores son media \pm E.E.M. de células SH-SY5Y controles ($n = 94$), o pertenecientes a los clones L1 ($n = 57$) y N1 ($n = 33$); *** $p < 0,001$ tras comparar con el control.

En conjunto, los datos de la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en célula única corroboran los obtenidos previamente en poblaciones celulares. En este punto nos preguntamos si estos resultados podrían tener repercusión a nivel de la neurosecreción. Los siguientes experimentos, realizados también en célula única y poblaciones celulares de SH-SY5Y, se diseñaron para dar respuesta a esta cuestión.

2.4 Efecto de la sobreexpresión de dup α 7 sobre la exocitosis inducida por PNU 282987 en célula SH-SY5Y única.

Como hemos mencionado anteriormente, el $\Delta [Ca^{2+}]_i$ produce la activación del complejo de proteínas SNARE lo cual desencadena la exocitosis vesicular y el vertido de su contenido (neurotransmisor) al espacio sináptico. Los siguientes experimentos fueron diseñados para evaluar como afectaba la sobreexpresión de dup α 7 al proceso exocitótico en células SH-SY5Y individuales. Se utilizó la sonda fluorescente FM1-43 para marcar externamente la membrana celular y, posteriormente, seguir el proceso de endocitosis y exocitosis de la membrana marcada en respuesta a la activación del α 7-nAChR con 1 μ M de PNU 282987 [+1 μ M MAP]. El protocolo experimental seguido en estos experimentos guardaba mucho parecido al descrito previamente para el estudio de la señal de $[Ca^{2+}]_i$.

En la figura 53 se muestran dos registros fluorimétricos originales obtenidos en una célula control y otra con sobreexpresión de dup α 7 (clon L1) sometidas a la estimulación sucesiva con PNU 282987 y alto K^+ . En la parte superior de cada uno de los dos registros se representa un gráfico que simula lo que acontece con la membrana plasmática y la vesícula en respuesta a cada estímulo, la endocitosis de la membrana celular generando una vesícula marcada con la sonda y la liberación de la sonda al espacio extracelular tras la fusión vesicular con la membrana plasmática (exocitosis).

El registro original en la célula control (panel A) muestra como la señal fluorescente decae de forma progresiva en respuesta al agonista nicotínico como resultado de la liberación de la sonda al espacio extracelular durante la exocitosis vesicular. La aplicación de un segundo estímulo con alto K^+ en la misma célula es incapaz de generar una respuesta exocitótica detectable al haberse agotado las vesículas marcadas con la sonda durante el estímulo del PNU 282987. El registro original en la célula con sobreexpresión de dup α 7 (panel B) difiere de forma notable con el anterior ya que la aplicación del agonista nicotínico no logra inducir el proceso de exocitosis y la consiguiente liberación de la sonda al espacio extracelular, algo que si consigue hacer el segundo pulso con alto K^+ aplicado a continuación, el cual produce una caída clara de la señal fluorescente hasta niveles basales.

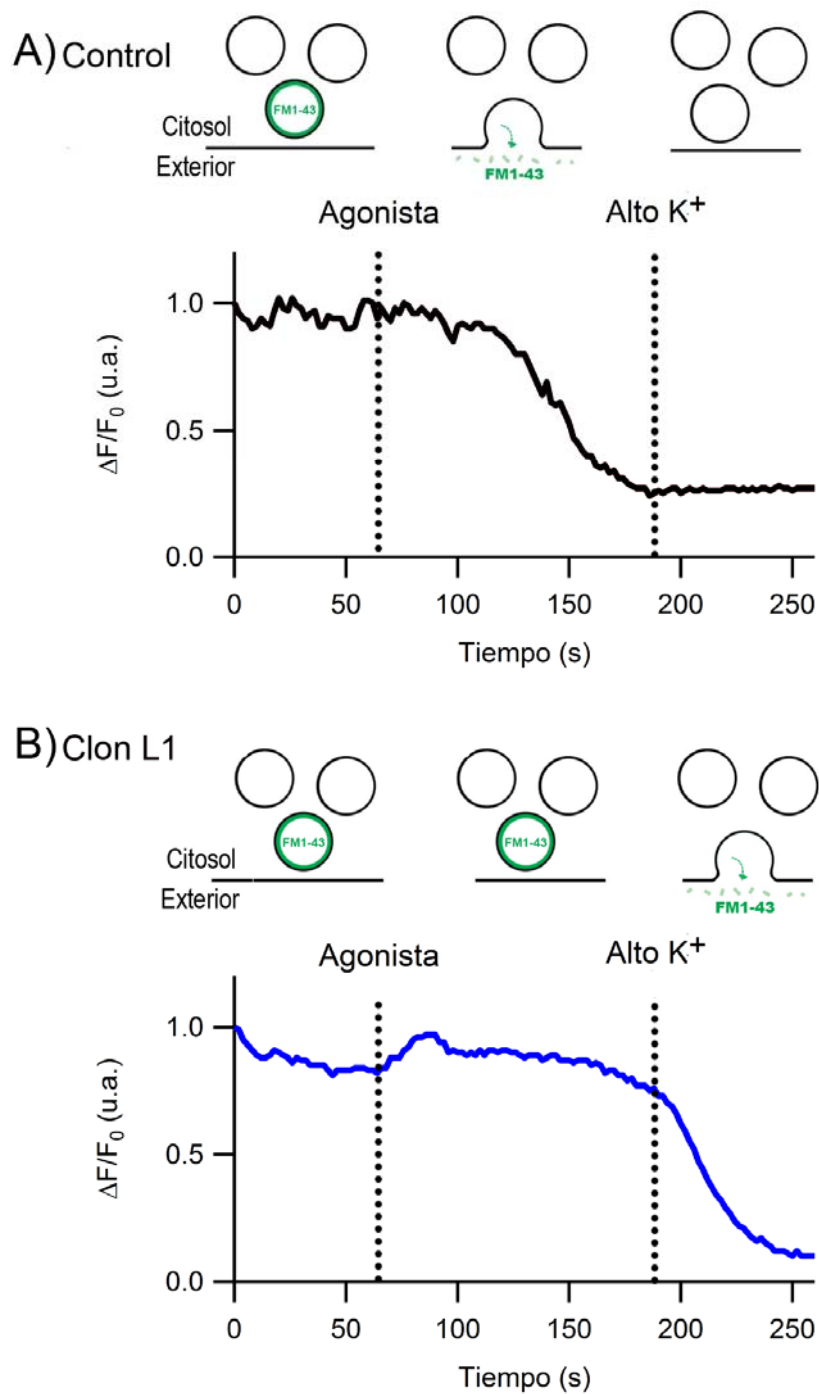


Figura 53: Registros originales de la señal fluorescente generada por la sonda FM1-43 en respuesta a dos estímulos sucesivos (PNU 282987 y alto K⁺) aplicados a una célula SH-SY5Y control y otra con sobreexpresión de dupα7 (clon L1). La sonda fluorescente, marcando la membrana celular, es endocitada junto a la vesícula por un pulso prolongado de alto K⁺ (100 mM, 4 min; ver *Materiales y Métodos*). La liberación de la sonda al espacio extracelular, en respuesta al agonista nicotínico o al alto K⁺, produce la caída de fluorescencia e indica que el proceso de exocitosis ha tenido lugar.

La descarga de la sonda al espacio extracelular en respuesta a PNU 282987, que refleja el proceso exocitótico inducido por el agonista, fue analizada en células controles ($n = 17$), células del clon L1 ($n = 23$) y células del clon N1 ($n = 15$). El curso temporal de descarga de la sonda, en respuesta al estímulo aplicado en la célula, se expresó como porcentaje de la señal fluorescente máxima (100 %) generada por la sonda antes de la aplicación del estímulo (Fig. 54). Los valores medios \pm E.E.M. de exocitosis obtenidos en cada grupo de células fueron los siguientes: $20,5 \pm 1,8$ % (control); $2,1 \pm 0,7$ % (L1) y $6,5 \pm 1,6$ % (N1), respectivamente. El análisis estadístico de los datos indica que la sobreexpresión de dup α 7 provoca una reducción de la exocitosis, estadísticamente significativa, respecto a la observada en células control (Fig. 56B). Estos datos son congruentes con nuestro hallazgo previo relativo a la disminución de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por PNU 282987 en los clones L1 y N1 respecto a la señal generada por el mismo estímulo en células controles (Fig. 51).

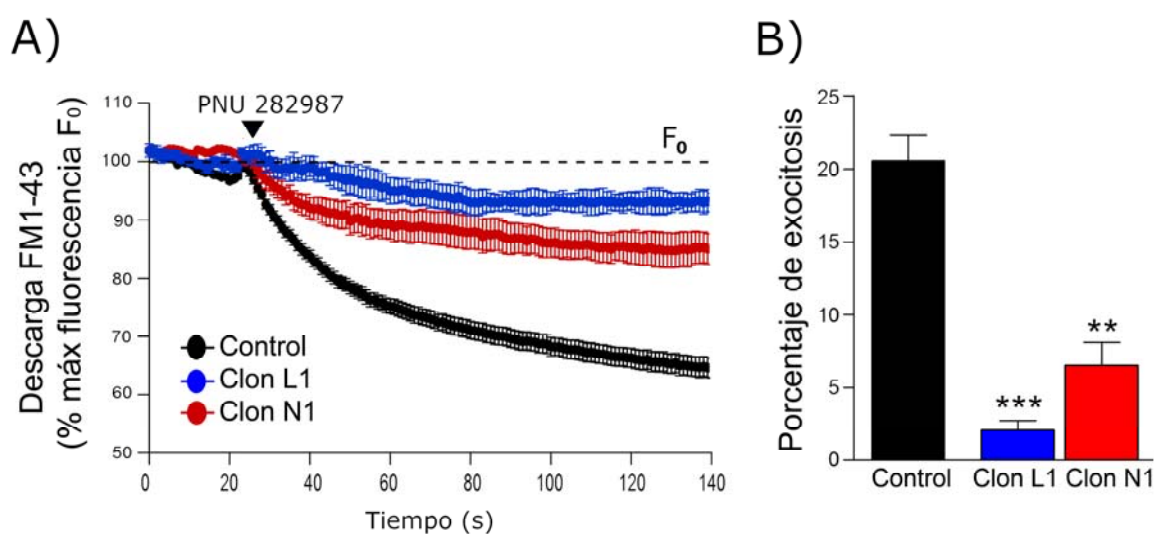


Figura 54: Descarga de FM1-43 inducida por PNU 282987 en células SH-SY5Y controles o con sobreexpresión de dup α 7. A) Curso temporal de la caída de la señal fluorescente, reflejando la liberación de la sonda al espacio extracelular y la exocitosis, en respuesta a PNU 282987 (1 μ M) aplicado a células controles ($n = 3$) y células de los clones L1 ($n = 3$) y N1 ($n = 4$). La señal fluorescente, antes de aplicar el estímulo (F_0), representa el valor máximo de fluorescencia (100%). La flecha indica el momento de aplicación del estímulo. B) Porcentaje de exocitosis inducida por el agonista nicotínico en cada grupo celular; los valores representan la media \pm E.E.M. de las células analizadas. ** $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ con respecto al control.

2.5 Efectos de la sobreexpresión de dup α 7 y del silenciamiento génico de dup α 7 endógeno sobre la liberación de dopamina en poblaciones de células SH-SY5Y.

El efecto de la sobreexpresión de dup α 7 sobre la exocitosis en célula SH-SY5Y única nos condujo a explorar si dicho efecto se reproducía a nivel de la liberación del neurotransmisor (dopamina, DA) en poblaciones de estas mismas células. Si la respuesta era afirmativa, y el dup α 7 endógeno desempeña algún papel en la neurotransmisión, cabría pensar que el silenciamiento de esta subunidad se traduciría en un incremento de la respuesta secretora celular mediada por el α 7-nAChR.

Los siguientes experimentos arrancaron con la transfección de células SH-SY5Y controles con tres ARN de interferencia de pequeño tamaño (siRNA) diseñados para silenciar, específicamente, el gen *CHRFAM7A* (siRNA-1, siRNA-2 y siRNA-3). Como control negativo del silenciamiento, se transfectó también un tercer siRNA (siRNA control) que no reconoce la secuencia nucleotídica del gen. La Tabla 12 muestra las secuencias de las 4 parejas de oligos de siRNA utilizados en este trabajo. El grado de silenciamiento del dup α 7 producido por cada pareja de siRNA se comprobó por qPCR y por inmunoblot. Los resultados de ambos análisis revelan que mientras el siRNA-2 se mostró ineficaz para silenciar el gen, las parejas siRNA-1 y siRNA-3 reducían significativamente el nivel de expresión del ARNm (Fig. 55A) y de la proteína (Fig. 55B) de dup α 7 respecto a los valores de expresión obtenidos en células no transfectadas o transfectadas con el siRNA control. A pesar de que los genes *CHRFAM7A* y *CHRNA7*, que codifican para dup α 7 y α 7, presentan una elevada homología en sus secuencias nucleotídicas, los siRNA-1 y siRNA-3 se muestran selectivos para silenciar el primer gen y no el segundo, tal como se deduce por su falta de efecto para silenciar la expresión del α 7 ARNm (Fig. 55A). La misma figura muestra como la expresión del *CHRNA7* tampoco se ve afectada por ninguna de las otras dos parejas de siRNAs (siRNA-2 y siRNA control). Dado que el siRNA-1 fue ligeramente más eficiente que el siRNA-3 para silenciar el *CHRFAM7A*, tanto a nivel del mensajero como de la proteína, se seleccionó el primero para analizar la repercusión que el silenciamiento del dup α 7 endógeno tenía sobre la secreción mediada por el α 7-nAChR en poblaciones celulares.

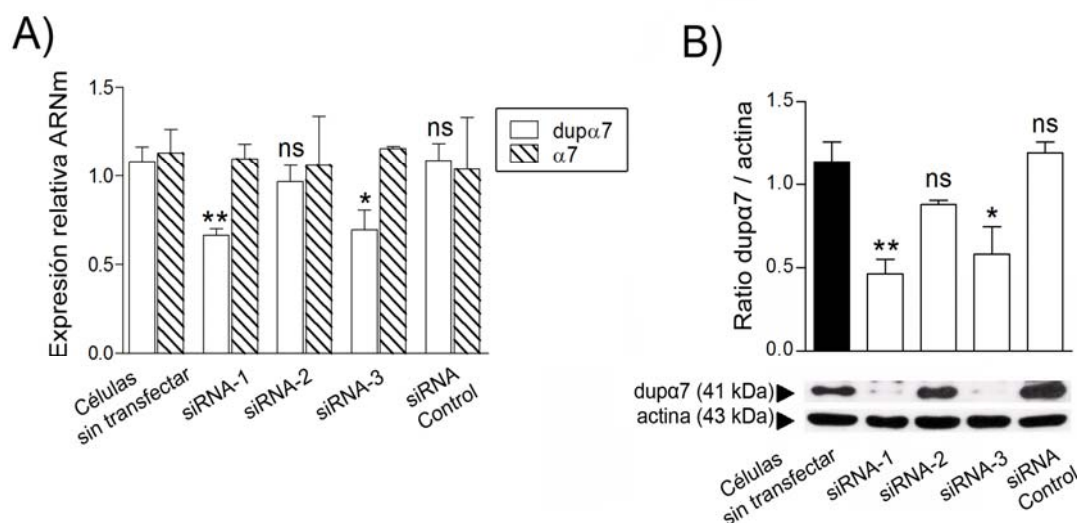


Figura 55: Silenciamiento del gen *CHRFAM7A* por distintos siRNAs en poblaciones celulares de SH-SY5Y. A) Expresión normalizada de los transcritos de *dupα7* y *α7* tras la transfección celular con tres parejas de siRNAs específicos para el gen *CHRFAM7A* que codifica para *dupα7* ARNm, o la transfección de un siRNA no específico para el gen (siRNA control). B) Inmunoblot representativo mostrando el efecto de las 4 parejas de siRNAs sobre la expresión de la proteína *dupα7*. Los datos de ambas graficas son media ± E.E.M. de 3 cultivos diferentes transfectados con todos los siRNAs. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ tras comparar con células sin transfectar.

Los siguientes experimentos se realizaron para determinar, por ELISA, la secreción de DA inducida por dos estímulos [PNU 282987 (+ MAP) y alto K^+] aplicados a tres poblaciones celulares de SH-SY5Y: sin transfectar, con sobreexpresión de *dupα7* (clon N1) o con el *dupα7* endógeno silenciado por el siRNA-1 (Fig. 56). La liberación neta de DA, en respuesta a la activación del $\alpha7$ -nAChR, en 3 cultivos diferentes fue de 430 ± 117 pg/mg (no transfectadas), 161 ± 28 pg/mg (clon N1) y 916 ± 172 pg/mg (transfectadas con siRNA-1) (Fig. 56A). Tanto la reducción de la secreción del neurotransmisor en las células con sobreexpresión de *dupα7*, como la potenciación de la misma tras el silenciamiento de la subunidad, mostraron diferencias significativas respecto a la secreción de DA inducida por PNU 282987 en células sin transfectar. Las diferencias entre las tres poblaciones celulares no se aprecian cuando se cuantifica la liberación de DA inducida por el pulso despolarizante de alto K^+ [100 mM]. La figura 58 B muestra los valores de secreción de DA, respecto a la secreción evocada por alto K^+ en células no transfectadas (100 %), en respuesta a la aplicación de los dos estímulos en los 3 grupos celulares.

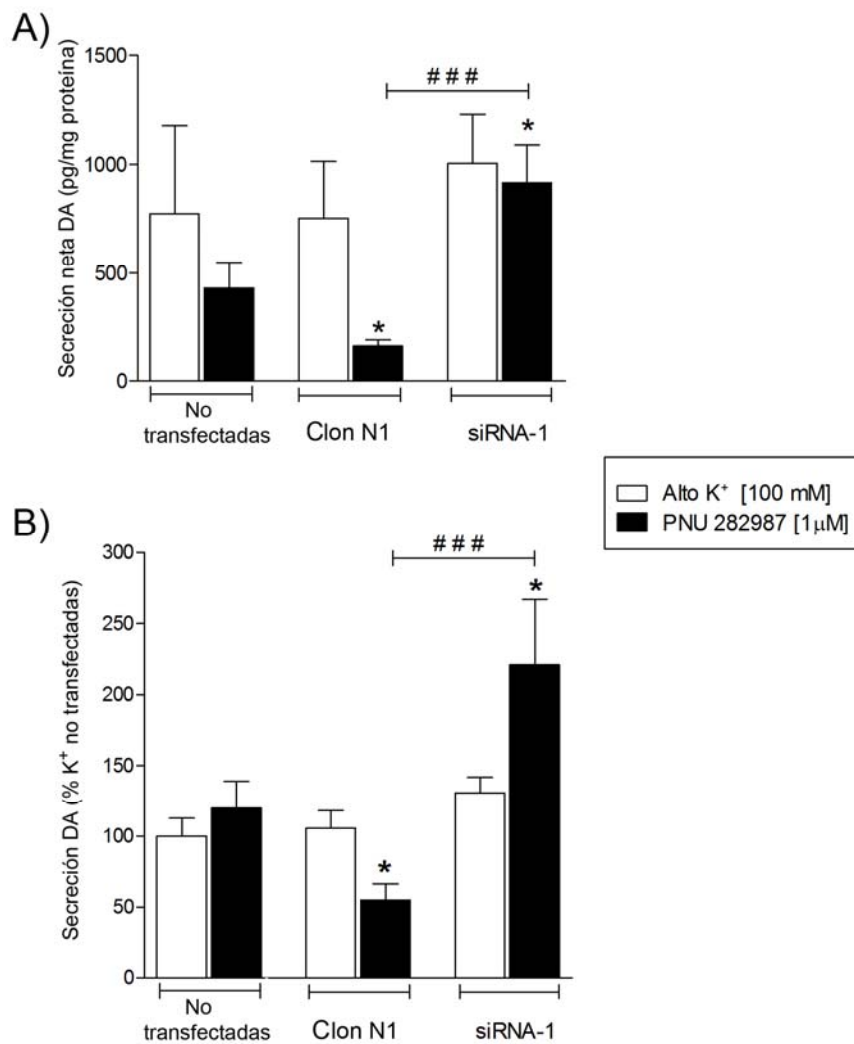


Figura 56: Efecto de la sobreexpresión o el silenciamiento de dup α 7 sobre la secreción de DA inducida por la activación del α 7-nAChR en poblaciones celulares de SH-SY5Y. Se utilizaron tres poblaciones celulares: no transfectada, con sobreexpresión de dup α 7 (clon N1) o con el gen *CHRFAM7* silenciado (siRNA-1). A) Secreción neta de DA inducida por PNU 282987 o alto K⁺; la secreción fue determinada por técnicas de ELISA y referida a la cantidad de proteína de la población celular ensayada. B) Secreción de DA inducida por los diferentes estímulos tras ser normalizada respecto a la secreción evocada por alto K⁺ en células no transfectadas (100 %). Los datos de las dos graficas, representando la media \pm E.E.M de 3 cultivos diferentes, fueron analizados por ANOVA con objeto de establecer las diferencias entre grupos. * p < 0,01 respecto a células no transfectadas. ### p < 0,001 tras comparar células del clon N1 con aquellas transfectadas con siRNA-1.

Si los anteriores resultados, obtenidos en SH-SY5Y, pudieran extrapolarse a otros tipos neuronales humanos, cabría la posibilidad de que la subunidad dup α 7 desempeñara algún papel fisiopatológico en el control de la neurotransmisión central mediada por el α 7-nAChR.

3. LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE $\alpha 7$ ARNm CORRELACIONAN DE FORMA NEGATIVA CON LA GRAVEDAD CLÍNICA DEL PACIENTE DEPRESIVO.

Una vez determinado el papel que ejerce $\text{dup}\alpha 7$ sobre los $\alpha 7$ -nAChRs en la neurotransmisión, sumado a la función que los $\alpha 7$ -nAChRs desempeñan en el control de la respuesta inflamatoria, nos preguntamos si la expresión de ambas subunidades podría contribuir a la gravedad de la depresión, puesto que, ambas funciones fisiológicas están implicadas en la etiopatogenia de la depresión. Para ello, se realizó un estudio piloto con un grupo de pacientes depresivos.

La muestra poblacional de la que se dispuso estuvo compuesta por 1) un grupo control de 33 individuos sanos, de los cuales 14 fueron hombres (42,4 %) y 19 mujeres (57,6 %) y 2) un grupo de 24 pacientes depresivos que constó de 3 hombres (12,5 %) y 21 mujeres (87,5 %). En la tabla del anexo 3 se resumen características clínicas de los pacientes.

Para corroborar en nuestra muestra poblacional el estado inflamatorio basal descrito en la literatura, durante la primera visita de los pacientes depresivos midieron las citoquinas IL-6, IL-1, IL-10 y $\text{TNF}\alpha$. Los resultados mostraron un aumento en los niveles de citoquinas (pg/ml) en el conjunto de pacientes depresivos (Tabla 17).

	Control	Depresivos
$\text{TNF}\alpha$	10 ± 7	$19 \pm 3^*$
IL-6	38 ± 14	39 ± 3
IL-10	21 ± 15	54 ± 10
IL-1	15 ± 9	20 ± 2

Tabla 17: Niveles de citoquinas en sangre. Los datos se representan como la media \pm E.E.M. (pg/ml) de los grupos señalados. * $p < 0,05$

Para el análisis de la expresión génica de las subunidades nicotínicas $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$, se extrajo el ARNm de células sanguíneas tanto de los pacientes depresivos como de los individuos del grupo control. Los niveles de dichos transcritos fueron normalizados al valor medio obtenido de un conjunto de individuos sanos que fue tomado como la unidad. La gravedad de la depresión fue establecida con la escala de Hamilton, cada paciente fue evaluado mediante esta herramienta en las distintas visitas al Servicio de psiquiatría del

Hospital la Paz. Para el estudio de la asociación entre ambos parámetros (expresión génica y gravedad), se procedió al estudio cuantitativo de la correlación entre dichos niveles de expresión y la puntuación obtenida en la escala de Hamilton.

El resultado mostró una excelente correlación inversa de las dos variables ($r: -0,72$). En la representación gráfica de dicha correlación (panel A, Fig. 57), se observaron unos puntos discordantes de la tendencia general del resto (puntos rojos). Estos valores de $\alpha 7$ ARNm correspondían a los pacientes refractarios al tratamiento, quienes representaron un 16,6 % del conjunto de pacientes. Este subgrupo de pacientes presentó una media de $\alpha 7$ ARNm de 27 ± 19 con un promedio de una puntuación de Hamilton de 15 ± 4 . Los niveles de $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ ARNm del mencionado subgrupo fueron excluidos de los siguientes análisis estadísticos. Descartando dichos datos, la correlación mejoró hasta alcanzar el valor de $r: -0,84$ (Panel A, figura 57). En contraposición, la expresión del gen *CHRFAM7A* no presentó correlación con la situación clínica de los pacientes ($r: 0,07$) (Panel B, figura 57).

Para un análisis cualitativo más representativo, se estratificaron los datos de acuerdo a la puntuación obtenida en la escala Hamilton quedando agrupados en las siguientes categorías: (Entre paréntesis se indica el número de datos que constituye cada grupo)

- 0 a 7: “No deprimidos” ($n = 16$)
- 8 a 18: “Depresión ligera a moderada” ($n = 14$)
- 19 a > 23 : “Depresión severa a muy severa” ($n = 15$)

Los resultados estadísticos indicaron que cuando los pacientes se encontraban en estado eutímico, por tanto agrupados como “No deprimidos”, poseían una fuerte expresión de $\alpha 7$ ARNm ($19,4 \pm 4,0$) que alcanzó diferencias significativas tanto con el grupo Control ($1,04 \pm 0,14$) como con los grupos “Depresión moderada” y “Depresión severa”. A pesar de su estado clínico, los pacientes agrupados en las categorías “Depresión moderada” y “Depresión severa” no presentaron diferencias significativas comparados con el grupo Control. Sí se produjeron diferencias significativas entre los niveles de $\alpha 7$ ARNm de los grupos “Depresión moderada” y “Depresión severa”. Este hecho resalta la correlación entre la gravedad de la depresión y la expresión de $\alpha 7$ ARNm que se observaba en el conjunto de los datos.

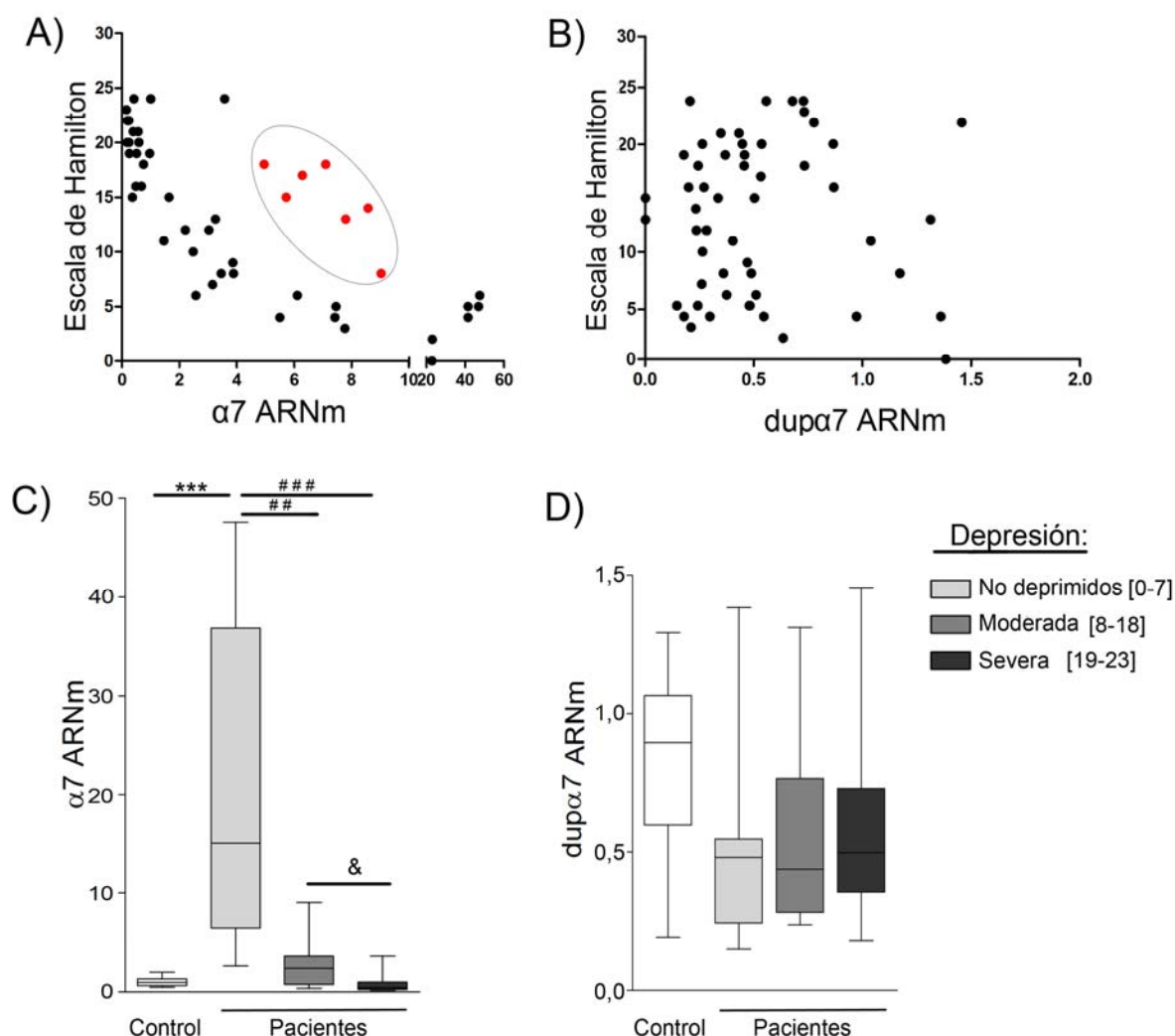


Figura 57: Representación cuantitativa y cualitativa de la correlación entre los niveles de $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ ARNm en los pacientes depresivos. A) Diagrama de correlación entre $\alpha 7$ ARNm y la puntuación obtenida en la escala de Hamilton. En rojo, se muestran los puntos correspondientes a los niveles de $\alpha 7$ ARNm de pacientes resistentes al tratamiento. B) Diagrama de correlación entre $\text{dup}\alpha 7$ ARNm y la puntuación obtenida en la escala de Hamilton. C) Estudio cualitativo de la relación entre $\alpha 7$ ARNm y la situación clínica del paciente. Nótese el incremento de $\alpha 7$ ARNm en los pacientes clasificados como “No deprimidos” frente a los grupos “Depresión moderada” y “Depresión severa”. D) Estudio cualitativo de la relación entre $\text{dup}\alpha 7$ ARNm y la situación clínica del paciente. Los valores se representan como la mediana (línea horizontal) y los percentiles 5 y 90 (barras verticales). *** $p < 0,001$ comparado a grupo control; ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ comparado a “No deprimidos”; & $p < 0,05$ comparado a “Depresión moderada”.

Es importante señalar que, a pesar de no existir diferencias significativas, el promedio del grupo “Depresión severa” supuso una reducción del 34 % en la expresión génica de *CHRNA* respecto al grupo control (Panel C, figura 57). El estudio cualitativo de la expresión de $\text{dup}\alpha 7$ ARNm no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes ni comparados con el grupo control (Panel D, figura 57).

Dada la alta correlación entre $\alpha 7$ ARNm y la gravedad clínica del paciente en el

conjunto de los datos, nos preguntamos si haciendo un seguimiento individualizado de cada paciente, se observaría esta correlación de forma tan contundente. Para ello, se realizó una correlación entre los valores $\Delta\alpha 7$ (diferencia entre los niveles de expresión de $\alpha 7$ ARNm de la 1ª visita y los niveles de la 2ª) y Δ Hamilton (diferencia entre la puntuación obtenida en el test Hamilton en la 1ª visita y la 2ª). Se obtuvo una correlación altamente significativa (r : -0,8293) (Fig. 58) poniendo de manifiesto la relación entre ambos parámetros no solo a nivel poblacional sino también a nivel individual.

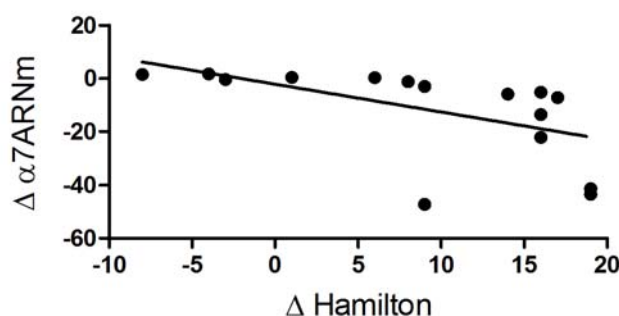


Figura 58: Representación de la relación intraindividual de $\alpha 7$ ARNm y la gravedad del paciente. Cada punto corresponde con la diferencia entre los valores de Hamilton obtenidos en las 2 primeras visitas del paciente frente a la diferencia de los niveles de $\alpha 7$ ARNm obtenidos en dicho momento. Para una mejor visualización de la correlación de $\alpha 7$ ARNm y la gravedad de los pacientes, se representó el nivel de expresión de $\alpha 7$ ARNm junto a la puntuación de Hamilton individualmente (Fig. 59).

Esta asociación entre $\alpha 7$ ARNm y la gravedad de la depresión, indica que la expresión de $\alpha 7$ ARNm puede ser un buen marcador del proceso evolutivo de la enfermedad, de tal forma, que los pacientes con un buen control de la respuesta inflamatoria presentaban menor gravedad.

Por ello, en los siguientes experimentos nos planteamos observar la modulación de la expresión de las subunidades $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ ARNm, en células neuronales y de microglía, tras un estímulo inflamatorio agudo.

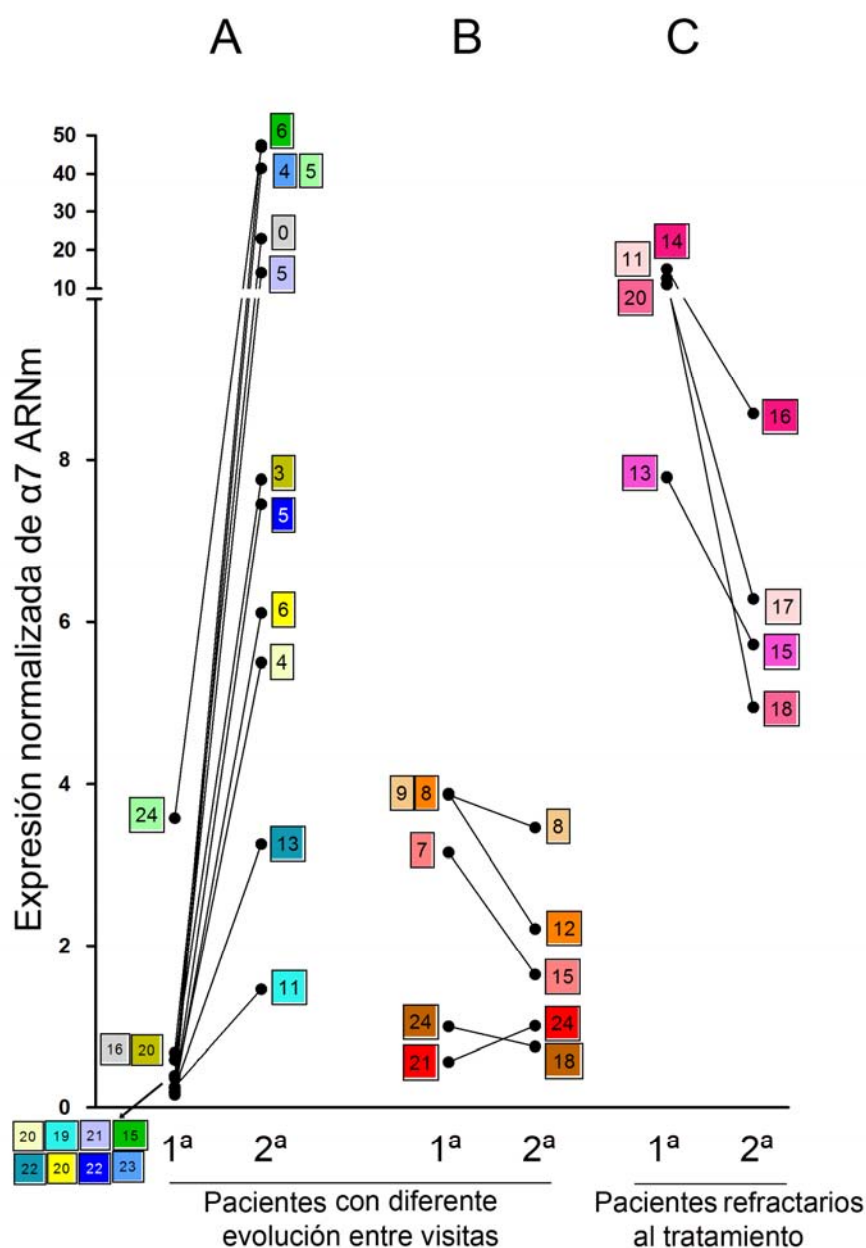


Figura 59: Representación de los niveles de $\alpha 7$ ARNm de los pacientes de forma individual junto con la puntuación obtenida en la escala de Hamilton (número enmarcado) en sendas visitas. Nótese que los pacientes cuya situación clínica mejoró (A) en la 2ª visita (menor puntuación con Hamilton) aumentaron sus niveles de $\alpha 7$ ARNm. Aquellos que por el contrario su estado se agravó o se mantuvo grave (B), vieron disminuidos la expresión de dicho transcrito. Los pacientes que clínicamente se agruparon como “No respondedores” (C), cuya puntuación en la escala de Hamilton los engloba en los grupos de “Depresión moderada” y/o “Depresión severa”, mantuvieron sus niveles de $\alpha 7$ ARNm altos en ambas visitas.

4. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE $\alpha 7$ Y $\text{dup}\alpha 7$ POR MEDIADORES INFLAMATORIOS.

La asociación observada entre los niveles de expresión de $\alpha 7$ ARNm y la gravedad de la depresión, nos llevó a estudiar el efecto de mediadores inflamatorios sobre la expresión de dicho transcrito en células neuronales y de microglía que pueda reflejar el efecto de la inflamación en células de SNC, como estaría sucediendo en la depresión. Por otro lado, el efecto modulador de $\text{dup}\alpha 7$ sobre la actividad del $\alpha 7$ -nAChR, nos llevó a estudiar la posible modulación de su expresión por estos mismos estímulos inflamatorios. Para ello, las células fueron estimuladas durante 24 h con concentraciones altas de diferentes citoquinas para mimetizar un estado inflamatorio agudo. La expresión de las subunidades $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ fue medida mediante qPCR y normalizada respecto a la expresión de las células sin tratar (control).

En las células SH-SY5Y, se observó la reducción del $\alpha 7$ ARNm tras la estimulación con las citoquinas proinflamatorias IL-6 ($0,8 \pm 0,07$) y TNF ($0,69 \pm 0,08$) obteniendo diferencias significativas respecto a las células control. El efecto de dichas citoquinas sobre $\text{dup}\alpha 7$ ARNm fue nulo, no lográndose diferencias significativas con ningún estímulo (Fig. 60).

Las células de microglía C13NJ mostraron un patrón de expresión diferente entre las subunidades nicotínicas $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ en respuesta a los distintos estímulos (Fig. 62). De esta forma, se observó una dramática reducción de $\alpha 7$ ARNm con IL-6, TNF α e IL-1 β ($0,16 \pm 0,02$; $0,12 \pm 0,01$; $0,24 \pm 0,04$, respectivamente) tras las 24 h de estímulo. Aunque no alcanzó diferencias significativas, sí se observó una tendencia al alza de $\alpha 7$ ARNm tras el estímulo con la citoquina antiinflamatoria IL-10. Respecto al efecto provocado por las citoquinas sobre la expresión de $\text{dup}\alpha 7$ ARNm no se alcanzaron diferencias significativas comparadas con las células control, aunque se observa un leve aumento en la expresión de dicho transcrito tras la incubación con la citoquina proinflamatoria IL-6 (Fig. 61).

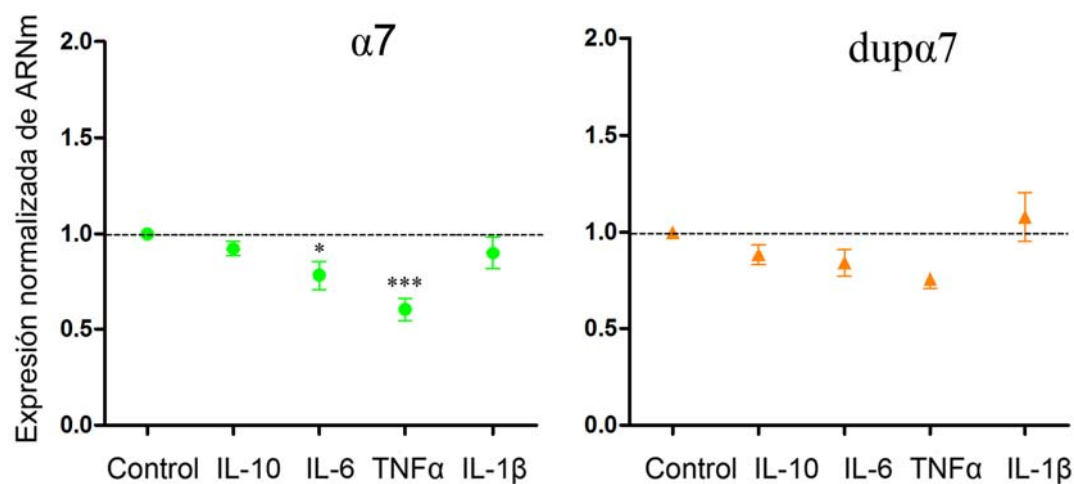


Figura 60: Representación de la expresión de $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ ARNm de las células SH-SY5Y. Los valores se representan como la media \pm E.E.M. correspondientes a 3 cultivos diferentes.

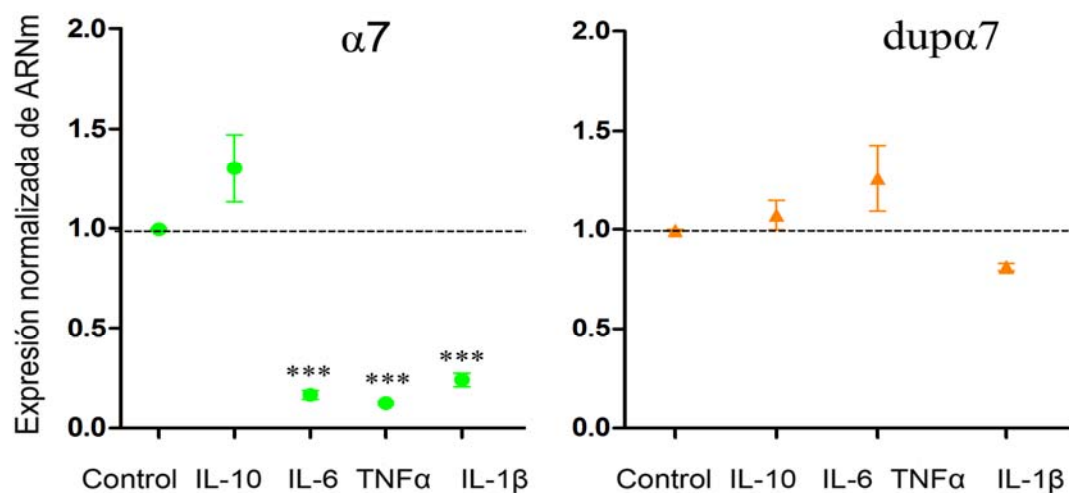


Figura 61: Representación de la expresión de $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ ARNm de las células C13NJ. Los valores se representan como la media \pm E.E.M. correspondientes a 3 cultivos diferentes.

5. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS DISTINTAS SUBUNIDADES NICOTÍNICAS POR FÁRMACOS ANTIDEPRESIVOS.

Dada la limitación de acceder a cultivos primarios de microglía humana y/o a la falta de líneas inmortalizadas de este tipo celular, no existe literatura que caracterice la expresión de nAChR por parte de estas células (excepto $\alpha 7$ -nAChR). De este modo, los resultados siguientes adquieren gran relevancia, no solo por su posible implicación fisiopatológica, sino también por su destacada novedad en la caracterización de la microglía humana.

Aunque la relación entre la patología de la depresión y los nAChRs parece estar soportada por diversas observaciones que han llevado a proponer su implicación en la misma, aún no están claros los efectos que poseen los tratamientos antidepresivos sobre la expresión génica de estas subunidades. En nuestros experimentos, quisimos comprobar si estos fármacos pueden actuar sobre la expresión de las subunidades nicotínicas y estar ejerciendo su acción antidepresiva por mecanismos alternativos al modo de acción descrito para ellos. Las células fueron incubadas con los distintos fármacos durante 24 h, 48 h y 7 días, tras los cuales se procedió a la extracción de ARNm. La cuantificación de los niveles de expresión de las distintas subunidades fue realizada mediante su amplificación con cebadores específicos y normalizada respecto a la expresión basal de las células sin tratar (control).

La estimulación con los antidepresivos, tanto con los clásicos, imipramina (ATC) y tranilcipromina (IMAO), como con los inhibidores de recaptación de 5-HT (fluoxetina) o NA (reboxetina), las modificaciones más relevantes se dieron sobre la expresión de las subunidades $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ las (Fig. 62).

La incubación con imipramina (10 μ M) provocó un incremento en la expresión de $\alpha 7$ ARNm hasta superar 3 veces la expresión basal, tanto en las células SH-SY5Y en las C13NJ (Fig. 62) durante las primeras 48 h. Pasado este tiempo, la expresión se normalizó hasta alcanzar valores basales. La subunidad dup $\alpha 7$, en las SH-SY5Y, mantuvo el mismo patrón de comportamiento que $\alpha 7$ ARNm, aumentando de forma significativa. Mientras que en las células C13NJ, imipramina no afectó a la expresión de dup $\alpha 7$ ARNm.

Por el contrario, el antidepresivo tranilcipromina (10 μ M) solo afectó de manera notable a $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ ARNm en las células C13NJ. En estas células, se produjo aumento

de $\alpha 7$ ARNm a los 7 días del tratamiento, mientras que no se observaron cambios en $\text{dup}\alpha 7$ ARNm (Fig. 62).

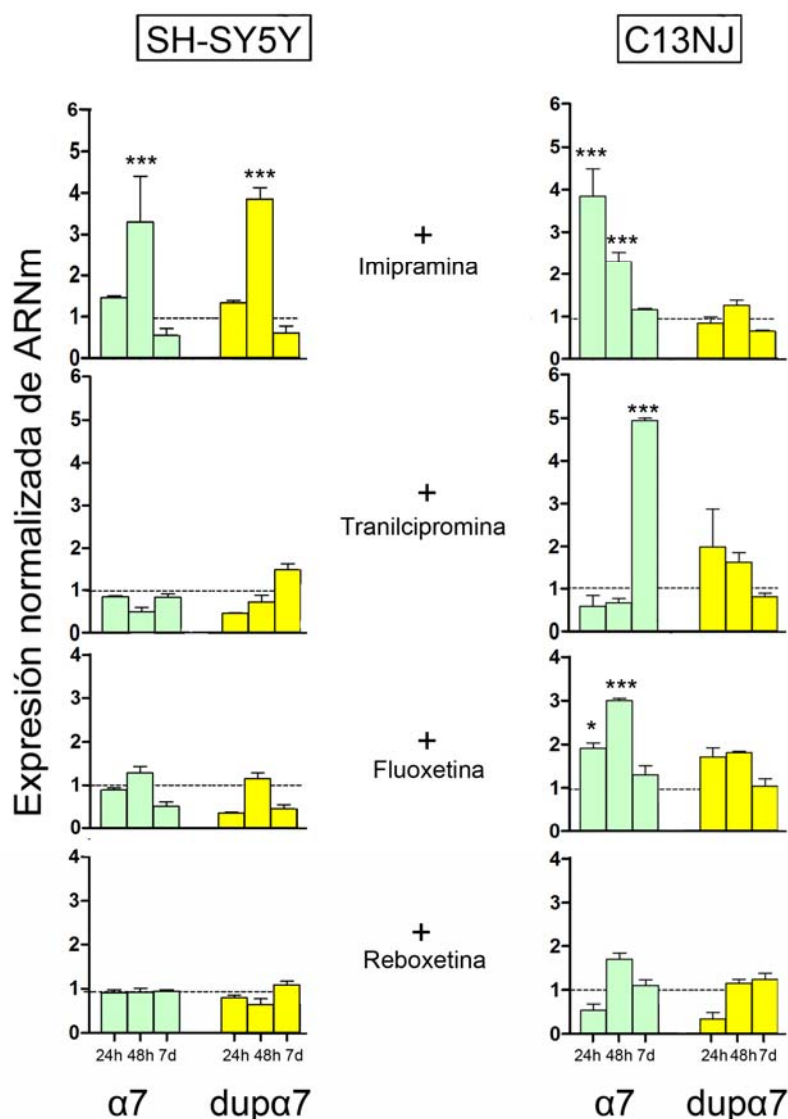


Figura 62: Representación de la expresión normalizada de ARNm de las subunidades $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ tras los estímulos de imipramina, tranilcipromina, fluoxetina y reboxetina. Los valores se representan como la media \pm E.E.M. * p < 0,05; *** p < 0,001.

Los antidepresivos más utilizados actualmente corresponden con inhibidores de la recaptación de neurotransmisores, entre ellos, la fluoxetina (inhibidor de la recaptación de 5-HT) y la reboxetina (inhibidor de la recaptación de NA). En los experimentos *in vitro* llevados a cabo en las SH-SY5Y, la fluoxetina (1 μ M) mostró una tendencia a disminuir los niveles de $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ ARNm, pero éstos no alcanzaron diferencias significativas

respecto a las células control. Por el contrario, las células C13NJ respondieron con un incremento notable de $\alpha 7$ ARNm tras 48 h de estímulo (Fig. 62). En ambos tipos celulares, reboxetina (10 μ M) no modificó la expresión de $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ de manera notable.

En relación al resto de subunidades nicotínicas ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, $\beta 2$ y $\beta 4$) resultó llamativo que, en las células SH-SY5Y, dichas subunidades no sufrieron modificaciones en su expresión tras la aplicación de estos 4 fármacos antidepresivos, con la excepción de la subunidad $\alpha 9$ (Fig. 63). La expresión de esta última subunidad aumentó significativamente con 3 de los 4 antidepresivos ensayados, reboxetina no mostró efecto. En las C13NJ, la incubación con imipramina produjo cambios en la expresión de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 9$, $\beta 2$ y $\beta 4$. Se produjo un incremento en los niveles de expresión de $\alpha 3$, $\alpha 9$ y $\beta 2$ ARNm desde las primeras 24 h de estímulo. Este efecto se mantuvo durante los 7 días de ensayo. La subunidad $\beta 4$ también aumentó en respuesta a imipramina pero tras 48 h de estímulo para volver a valores basales en ensayos a largo plazo (7 días). Esta misma subunidad incremento de forma significativa ante la incubación con fluoxetina y reboxetina. En la células C13NJ, el inhibidor selectivo de recaptación de NA, reboxetina, produjo un incremento de $\alpha 9$ y $\beta 2$. A diferencia de lo obtenido con imipramina, el incremento fue transitorio y no sostenido a lo largo de los días, volviendo a valores basales a las 48 h.

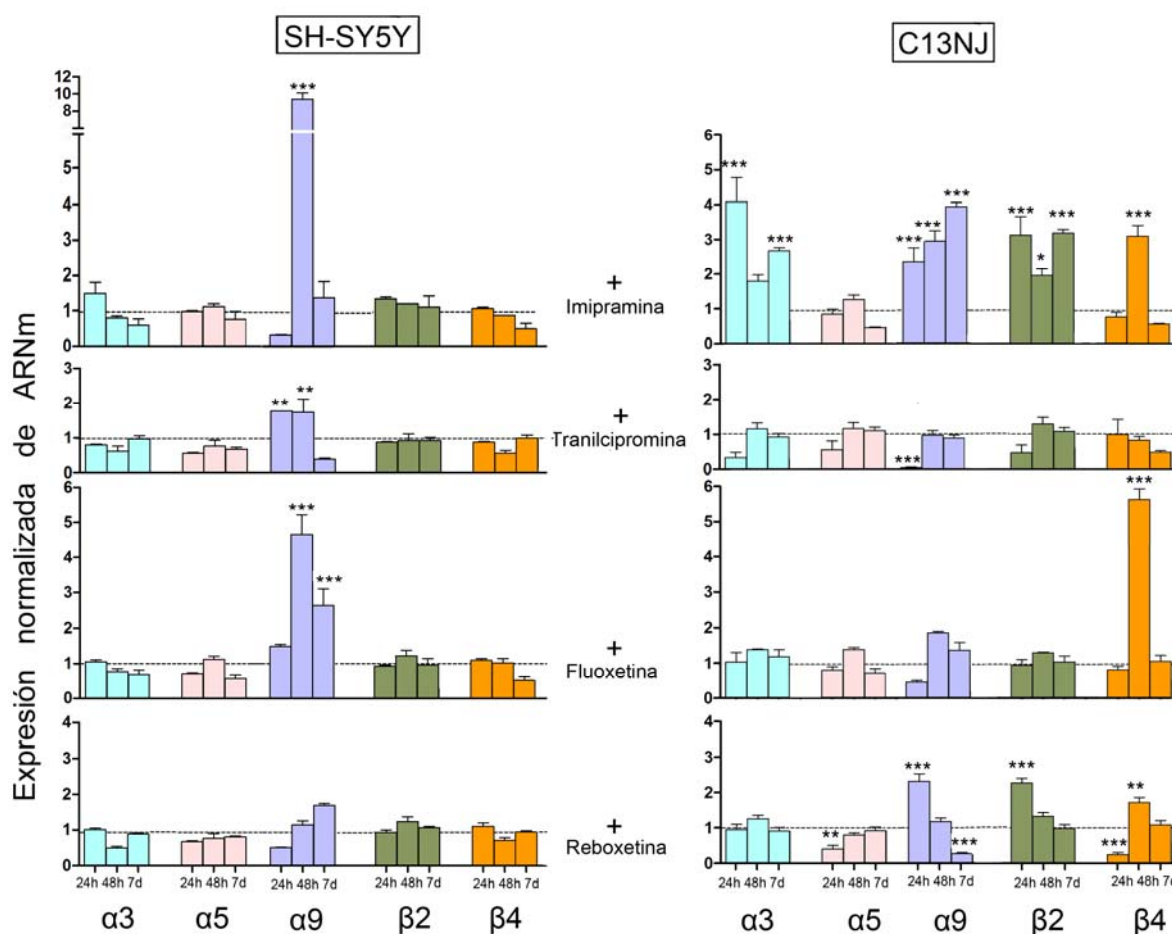


Figura 63: Representación de la expresión normalizada de ARNm de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 2$ y $\beta 4$. Los valores se representan como la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Como se ha mencionado en Materiales y Métodos, uno de los criterios para la elección de las concentraciones usadas fue el hecho de que éstas no causaran muerte celular en ensayos *in vitro*. Todos los fármacos antidepresivos se utilizaron a 10 μ M, excepto fluoxetina. La aplicación de fluoxetina a 10 μ M causó una disminución de la proliferación celular en ambos tipos celulares ($33 \pm 0,5$ % en las SH-SY5Y y 42 ± 3 % en las C13NJ) por lo que, dicha concentración fue desechada para los estudios de modulación génica. El resto de fármacos, no solo no produjeron muerte celular, sino que por el contrario, la proliferación celular incrementó en ciertas condiciones (Tabla 18).

	SH-SY5Y			C13NJ		
	24 h	48 h	7 d	24 h	48 h	7 d
Imipramina	114 ± 8	77 ± 1	102 ± 6	148 ± 3 ^a	98 ± 8	92 ± 19
Tranilcipromina	149 ± 14 ^a	137 ± 8 ^a	137 ± 9 ^b	101 ± 4	121 ± 6	88 ± 20
Fluoxetina	155 ± 8 ^a	120 ± 5	76 ± 3	101 ± 7	121 ± 6	100 ± 7
Reboxetina	114 ± 5	79 ± 12	83 ± 8	92 ± 2	121 ± 10	81 ± 8

Tabla 18: Cuantificación de la proliferación celular medida mediante el ensayo MTT. Expresada como porcentaje normalizado respecto a las células sin tratar (100 %); ^a p < 0,001; ^b p < 0,01.

Discusión

El trabajo de investigación desarrollado en esta Tesis se ha centrado en el estudio del papel fisiopatológico del $\alpha 7$ -nAChR, analizando el mecanismo por el que las subunidades $\alpha 7$ interaccionan con subunidades dup $\alpha 7$ en células de mamífero, así como las posibles consecuencias funcionales de dicha interacción, a nivel de la neurotransmisión. Por otra parte, se ha explorado la posible implicación en la neuroinflamación mediante el uso de células de microglía y la realización de un estudio piloto en pacientes depresivos.

Nuestros resultados en células de mamíferos muestran que las dos subunidades nicotínicas interaccionan físicamente entre sí constituyendo un nuevo receptor mixto $\alpha 7$ dup $\alpha 7$ -nAChR, capaz de migrar a la membrana celular. La formación de este nuevo receptor tiene una clara repercusión funcional en la neurotransmisión, disminuyendo el volumen final de neurotransmisor liberado mediante la activación específica de $\alpha 7$ -nAChR. Este efecto se debe a la incapacidad de unión del ligando a estos nuevos receptores, así como, a una reducción de $\alpha 7$ -nAChR homoméricos en membrana por retención de subunidades $\alpha 7$ en el RE.

Adicionalmente, nuestro trabajo incluye la caracterización de la expresión de las diferentes subunidades nicotínicas en una línea de microglía humana y su posible implicación en la etiopatogenia de la depresión mediante el control de la respuesta inflamatoria mediada por el $\alpha 7$ -nAChR.

A continuación se discuten los principales resultados del presente trabajo.

1. Identificación de un nuevo receptor nicotínico heteromérico: $\alpha 7$ dup $\alpha 7$ -nAChR.

El uso de construcciones episomales conteniendo proteínas de fusión (GFP y Cherry) para marcar las subunidades dup $\alpha 7$ y $\alpha 7$ nos permitió conocer su distribución celular. Nuestros resultados, en células GH4C1 transfectadas, indican que las subunidades $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ tienen diferente localización celular cuando son expresadas de forma individual. La subunidad $\alpha 7$ es altamente expresada en membrana mientras que dup $\alpha 7$ es, principalmente, localizado en el área submembranal que probablemente coincide con su retención en el RE (Paneles A y B; Fig. 38). Esto concuerda con el hecho de que la subunidad dup $\alpha 7$ carece del péptido señal que permite la migración a membrana citosólica (Gault y col. 1998). Esta diferencia de acceso a la membrana, entre las dos subunidades, ya fue observado por nuestro grupo en ovocitos (de Lucas-Cerrillo y col. 2011). Sin embargo, la expresión de $\alpha 7$ en membrana es modulable mediante la interacción con dup $\alpha 7$. Así, nuestros resultados evidenciaron una disminución significativa de $\alpha 7$ en membrana en células GH4C1 cotransfectadas (Panel C, Fig. 38) que podría deberse a un secuestro de dicha subunidad en el RE. De esta forma, la primera posibilidad es, que dup $\alpha 7$ interacciona con el tráfico celular de $\alpha 7$ hacia membrana, impidiendo su acceso a la misma. Esta posibilidad ha sido propuesta por distintos autores (de-Lucas-Cerillo y col. 2011, Araud y col. 2011). A pesar de ello, la formación de receptores mixtos $\alpha 7$ dup $\alpha 7$ -nAChR y localización en membrana citosólica es compatible con este efecto.

Para la demostración de la existencia de estos receptores heteroméricos, primero hubo que identificar la interacción física entre las subunidades. Este objetivo se alcanzó con la técnica de FRET. En los tres tipos celulares, GH4C1, RAW264.7 y SH-SY5Y, en los que se realizaron dichos experimentos, se demostró la interacción física entre $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ (Figs. 41, 42 y 43). La eficacia obtenida (% FRET) en la formación de receptores heteroméricos fue diferente entre los distintos tipos celulares. Este resultado, probablemente, se debe a las características intrínsecas de cada tipo celular. Así, por ejemplo, hay que recordar que las células GH4C1 son un buen modelo de expresión heteróloga para $\alpha 7$ -nAChR puesto que no posee endógenamente ninguna de las dos pero sí la chaperona RiC-3 (Sweileh y col., 2000; Mexal y col., 2010; Lee y col., 2009). Sin embargo, las células RAW 264.7 presentan una buena expresión endógena del receptor

$\alpha 7$ nAChR (Li y col., 2009) pero al ser células murinas carecen del gen *CHRFAM7A*, obteniendo así un modelo intermedio donde estudiar la formación del receptor heteromérico. El último paso, nos llevó al uso de las células neuronales SH-SY5Y que presentan de forma endógena la expresión de ambas subunidades. Las células SH-SY5Y fueron las células con menor eficiencia en la formación de receptores mixtos (Fig. 43), probablemente debido a que hay una mayor competencia para interaccionar entre las subunidades transfectadas y las subunidades endógenas, lo que conlleva un alto número de combinaciones posibles. Otra característica, que podría estar interfiriendo en la diferente eficiencia lograda, es la expresión endógena de chaperonas que faciliten el ensamblaje de los receptores. En todos los casos, la eficiencia de FRET aumentó cuando la molécula donadora de energía (GFP) era portado por la construcción con dup $\alpha 7$, puesto que la expresión de esta subunidad suele ser menor (por su baja tasa de traducción) y, por tanto, es mayor la probabilidad de tener $\alpha 7$ -Cherry adyacentes a ella (Wang y col. 2014).

En base a estos resultados, junto con la coexpresión endógena de las subunidades $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ descrita en múltiples tipos celulares y tejidos diferentes (Costantini y col. 2015) y la expresión en sistemas heterólogos (de Lucas-Cerrilo y col. 2011, Benfante y col. 2011; Wang y col. 2014, se podría afirmar que la existencia de $\alpha 7$ dup $\alpha 7$ -nAChR nativos sí resulta una posibilidad factible. Diversos autores han propuesto, con anterioridad, este hecho (Villiger y col. 2002; Benfante y col. 2011).

Mediante estudios con citometría de flujo, demostramos, por primera vez, la formación del $\alpha 7$ dup $\alpha 7$ -nAChR. Aunque los resultados por FRET podrían interpretarse como resultado positivo de la presencia de este receptor, lo cierto es que dicha interacción podría darse a nivel submembranal y que $\alpha 7$ dup $\alpha 7$ -nAChR no llegase a membrana. Para ratificar la existencia de dicho receptor mixto y su identificación, utilizamos un protocolo de marcaje extracelular. A través del epítipo myc, situado en el C-terminal de la subunidad dup $\alpha 7$, pudimos identificar la localización de esta subunidad, dup $\alpha 7$ -myc en membrana al marcar las células con el anticuerpo anti-myc sin una permeabilización previa. Esto significa que, la subunidad dup $\alpha 7$ -myc se encuentra ubicada en membrana citosólica y, para ello, debe estar formando parte de un receptor mixto. De esta forma, hemos podido identificar un nuevo subtipo de receptor heteromérico en células de mamífero.

Además, con estos experimentos se realizó la primera aproximación empírica a la consecuencia funcional de la expresión de $\alpha 7$ dup $\alpha 7$ -nAChRs en membrana celular. En concordancia con resultados previos de nuestro grupo (de Lucas-Cerrillo y col. 2011), nuestros datos revelaron que la expresión de dup $\alpha 7$ -myc o dup $\alpha 7$ -Cherry fue capaz de reducir el número de $\alpha 7$ -nAChRs funcionales (marcados con α -Bgtx-Alexa 488) en la membrana citosólica de células RAW 264.7 (Fig. 44). Este efecto, podría deberse al secuestro de subunidades $\alpha 7$ en el RE y/o a la formación de $\alpha 7$ dup $\alpha 7$ -nAChR incapaces de unir el ligando. Actualmente, solo un estudio con células THP-1, monocitos humanos, ha indicado el efecto contrario, es decir, que la sobreexpresión de dup $\alpha 7$ causó un aparente incremento de los sitios de fijación de α -Bgtx (Costantini y col. 2015). Sin embargo, dichos autores ignoran que estudios previos con células THP-1 mostraron que, aunque estas células poseen el gen *CHRNA7*, no son capaces de transcribirlo a ARNm, por lo que finalmente, carecen de la proteína resultante (Benfante y col. 2011). Nuestro grupo ha demostrado que los monocitos humanos (obtenidos de sangre periférica de donadores), sí expresan $\alpha 7$ ARNm (Cedillo y col. 2014) pero tienen una señal casi indetectable de α -Bgtx (Maldifassi y col. 2014). Únicamente, cuando son diferenciados a macrófagos alcanzan una expresión de $\alpha 7$ -nAChR detectable mediante α -Bgtx (Maldifassi y col. 2014).

2. Obtención de clones de células SHS-Y5Y con sobreexpresión de dup $\alpha 7$.

La generación de líneas celulares con expresión estable de un gen de interés es esencial en un amplio rango de aproximaciones experimentales para el estudio funcional de genes, caracterización de nuevos fármacos o producción de proteínas recombinantes (Grimm 2004; Wurm 2004). Entre las opciones más sencillas de proceder para la obtención de una línea celular, con expresión estable, se encuentra la transfección de vectores eucariotas. Estos portan los elementos necesarios para el mantenimiento del plásmido en el citoplasma celular. Sin embargo, la estabilidad episomal es a menudo limitada, lo que conlleva a una pérdida gradual del vector transfectado. Para evitar este hecho y seleccionar solo células que han integrado el gen de interés en el ADN cromosómico, se someten a las células a una incubación con antibióticos selectivos. La resistencia a dichos fármacos proviene de las enzimas codificadas por genes que porta el propio plásmido. Tal es el caso del vector pcDNA3.1/myc-His usado en este trabajo para la transfección de

dup α 7, que porta la enzima neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico (G418) (Siuthern y Berg 1982).

La selección de la construcción dup α 7.pcDNA3.1/myc-his para los estudios funcionales, frente a las construcciones con proteínas fluorescentes, fue debida a las características del epítipo c-myc. Aunque ha quedado demostrada la migración de dup α 7-Cherry a membrana mediante los ensayos de colocalización y citometría de flujo, el elevado tamaño de mCherry (236 aa) podría interferir en la correcta función del receptor α 7dup α 7-nAChR. Por lo que, se decidió utilizar una construcción con un “marcador” más pequeño que evitara alteraciones en la interacción y migración de los receptores formados. El pro-oncogen c-myc, utilizado como epítipo, consta de solo 10 aa reuniendo así las características requeridas. Además, como ya se ha mencionado, se encuentra localizado en el extremo C-terminal de la subunidad dup α 7 permitiendo su detección extracelular sin necesidad de permeabilizar las células. Una vez seleccionada la construcción, procedimos a transfectar la línea celular SH-SY5Y. Este tipo celular es un modelo neuronal muy utilizado en neurobiología por sus características similares a neuronas dopaminérgicas (Kovalevich y Langford 2013). Los métodos de transfección elegidos fueron lipofección y nucleofección. Mientras que el primero es un método químico, basado en la formación de liposomas que envuelven al plásmido y lo transportan al interior celular, el segundo es una combinación de la electroporación clásica y el uso de “bufferes” específicas para cada tipo celular. Nuestros resultados indican que ambos métodos presentan diferencias en la eficiencia. Así pues, la nucleofección obtuvo un mayor porcentaje de eficiencia frente a la lipofección. Estos datos están en concordancia con las observaciones de otros autores en diferentes líneas celulares de mamíferos (Maurisse y col. 2010; Hashemi y col. 2012; Sharifi y Tabar 2015). El parámetro utilizado para determinar la eficiencia fue el número de clones positivos respecto al número de clones recogidos. La nucleofección consiguió un número superior de clones positivos frente a la lipofección (Sharifi y Tabar 2015). Adicionalmente a este parámetro, la nucleofección permitió un incremento mayor en la expresión de dup α 7 ARNm en sus clones (Panel B, Fig. 46). Este efecto podría deberse a las diferencias en la abundancia y distribución intracelular del plásmido observadas entre ambos métodos (Magin y col. 2013). De hecho, se ha observado una mayor concentración de plásmido en citoplasma de células lipofectadas frente a la cantidad presente en células nucleofectadas. Esto podría explicarse por una menor integración del

episoma en el ADN cromosómico de las células tras la lipofección, manteniéndose el plásmido extranuclear (Magin y col. 2013).

A pesar de la diferencia en la expresión de ARNm obtenida tras ambos métodos de transfección, no obtuvimos diferencias significativas en los niveles proteicos de la $\text{dup}\alpha 7\text{-myc}$ entre los dos clones (Panel E, Fig. 46). De manera general, la aceptación del Dogma De Biología Molecular nos lleva a correlacionar los niveles de expresión de ARNm y proteína. Sin embargo, a menudo, los niveles de expresión de proteínas correlacionan pobremente con la expresión del ARNm (Vogel y Marcotte 2012; Ly y col. 2014). Este hecho puede deberse a la traducción de ARNm a proteína está condicionada por diferentes factores, entre ellos, la abundancia del transcrito, la proporción presente de polisomas (denominada “ocupación ribosomal”), la densidad de ribosomas y la velocidad de síntesis de la proteína (Arava y col. 2003; Beilharz y Preiss 2004; Beyer y col. 2004; Brockmann y col. 2007).

3. El nuevo $\alpha 7\text{dup}\alpha 7\text{-nAChR}$ tiene consecuencias funcionales a nivel de la neurotransmisión.

La relevancia fisiopatológica de la existencia de este nuevo receptor viene dada por la consecuencia funcional sobre las actividades realizadas por $\alpha 7\text{-nAChR}$ a nivel de la neurotransmisión. En este trabajo de Tesis se observa, por primera vez, el efecto fisiológico sobre la neurotransmisión consecuencia de la interacción de las subunidades $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$. La base del estudio fue el acoplamiento dado entre el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la exocitosis vesicular de los neurotransmisores. Partiendo de los clones de sobreexpresión estable de $\text{dup}\alpha 7$, se realizaron curvas dosis-respuesta de incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por un estímulo específico para el $\alpha 7\text{-nAChR}$ en poblaciones celulares. La especificidad vino dada por el uso de un agonista selectivo, PNU 282987 (Hajos y col. 2005), así como de un MAP tipo II exclusivo para dicho receptor; PNU 120596 (Hurst y col. 2005; Gronlien y col. 2007). Nuestros resultados revelan que la sobreexpresión de $\text{dup}\alpha 7$ provoca una drástica disminución en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reduciendo la amplitud máxima de la respuesta (Panel A, Fig. 49). Este mismo resultado pudo ser corroborado por los experimentos realizados en célula única (Figs. 50 y 51). Por lo tanto, se puede concluir, que la eficacia del agonista se ve afectada por la presencia de la subunidad $\text{dup}\alpha 7$. Esta pérdida de actividad intrínseca de PNU 282987 se debió a un menor número de $\alpha 7\text{-nAChRs}$ funcionales en membrana como se deduce de los

experimentos con α -Bgtx en células RAW264.7. Con aproximaciones experimentales diferentes, nuestro grupo (de Lucas-Cerrillo y col. 2011) y, de forma posterior, otro (Araud y col. 2011), observaron resultados similares a través de la expresión de $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ en sistemas de expresión heteróloga (ovocitos y células SH-EP1). En ambos casos, se observó una disminución de la respuesta inducida por ACh mostrando el efecto dominante negativo que ejerce dup $\alpha 7$ sobre la activación de $\alpha 7$ -nAChR. Por el contrario, esta acción de dup $\alpha 7$ ha sido puesta entredicho por resultados obtenidos a través de la expresión heteróloga de $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ en células Neuro2a (Wang y col. 2014). Estos últimos autores aseguran que la presencia de dup $\alpha 7$ no tuvo efecto sobre las corrientes inducidas por ACh. Sin embargo, este dato podría explicarse por el ratio $\alpha 7$ /dup $\alpha 7$ usado en la transfección y la baja eficiencia en la traducción de la subunidad dup $\alpha 7$ respecto a la eficiencia en la síntesis de $\alpha 7$. La necesidad de un número importante de subunidades dup $\alpha 7$ para que dicha subunidad pueda ejercer su efecto sobre $\alpha 7$, se podría explicar dada la característica única de activación del $\alpha 7$ -nAChR. Se ha comprobado que el $\alpha 7$ -nAChR solo necesita un sitio de unión al ligando activo para desencadenar la máxima respuesta (Andersen 2013). Es decir, $\alpha 7$ -nAChRs con una sola molécula de agonista unida inducen la misma respuesta que $\alpha 7$ -nAChRs con los 5 sitios ocupados por ligandos (Williams y col. 2011; Andersen y col. 2013). Por lo que, para que $\alpha 7$ -nAChR quedara completamente inactivo se requeriría de, al menos, la incorporación de 3 subunidades de dup $\alpha 7$ que impidieran la formación de todos los sitios de unión del ligando. Esta parece ser una característica única de este subtipo de nAChR, y contradice la observación clásica que indica que la ocupación de múltiples sitios maximiza la estabilidad del canal en estado abierto conduciendo a una mayor amplitud en la respuesta (Sine y col. 2012). De la misma forma, la ocupación de un único sitio por el antagonista metilcaconitina (Palma y col. 1996) o α -Bgtx (daCosta y col. 2015) inhibe su función.

A pesar de la disminución en la eficacia del agonista, la sobreexpresión de dup $\alpha 7$ no altera la cinética de la respuesta inducida por dicho agonista. En el estudio de poblaciones celulares, los valores obtenidos con los clones L1 y N1 para los parámetros farmacológicos EC_{50} y pendiente de la curva-dosis respuesta, fueron idénticos a los logrados con las células control (Panel B, Fig. 49). Esto demuestra que la afinidad del agonista y la cinética de activación del $\alpha 7$ -nAChR, no se ven afectadas por la presencia de subunidades dup $\alpha 7$ en el pentámero. Asimismo, en el análisis del incremento de

$[Ca^{2+}]_i$ en células únicas, los parámetros de “tiempo al pico” y “ τ de caída” permanecieron inalterables (Tabla 16) en las células con sobreexpresión de dup $\alpha 7$, demostrando que el tiempo de apertura y cierre del canal no se vio modificado. El mantenimiento de la afinidad y sensibilidad del receptor por el agonista ya fue descrito en ovocitos de *Xenopus* inyectados con $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ ARNm (de Lucas-Cerrillo y col. 2011; Araud y col. 2011).

En el proceso de neurotransmisión, el acontecimiento sucesivo al incremento de $[Ca^{2+}]_i$ en el terminal presináptico es la liberación del neurotransmisor a la hendidura sináptica. Por consiguiente, nos propusimos averiguar si las células con sobreexpresión de dup $\alpha 7$ mostrarían una reducción de la exocitosis vesicular. Nuestros resultados confirmaron dicha hipótesis. Mediante la descarga de la sonda FM1-43 inducida por la activación del $\alpha 7$ -nAChR, pudimos comprobar que la exocitosis vesicular está drásticamente reducida en estas células frente a las células SH-SY5Y control (Fig.54), confirmándose, el efecto modulador negativo de dup $\alpha 7$.

Si la subunidad dup $\alpha 7$ actúa negativamente en la actividad del $\alpha 7$ -nAChR, es previsible que el silenciamiento génico de dicha subunidad potencie las funciones mediadas por el $\alpha 7$ -nAChR. A través de la herramienta genética de siRNA, comprobamos que, efectivamente, la liberación del neurotransmisor DA, por parte de las células con *CHRFAM7A* silenciado, aumentó de forma significativa respecto a las células control (Fig. 56). De esta forma, nuestro grupo es el primero en poder afirmar, con rotundidad, que la subunidad dup $\alpha 7$ ejerce como modulador negativo del $\alpha 7$ -nAChR en células neuronales de mamífero.

Así pues, según nuestro criterio, basado en los resultados aquí discutidos, dup $\alpha 7$ debería ser aceptada como una nueva subunidad nicotínica en humanos, clasificada como subunidad auxiliar junto a las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 3$. Al igual que estas últimas, dup $\alpha 7$ carece del sitio de unión al ligando pero ejerce una importante función moduladora en el $\alpha 7$ -nAChR que la contiene. Es más, en 2014, Wang Y. demostró que dup $\alpha 7$ es capaz de interaccionar físicamente con otras subunidades nicotínicas $\alpha 3$ y $\alpha 4$, por lo que, podría estar modificando la expresión de diferentes n-AChRs.

4. Expresión del $\alpha 7$ ARNm como marcador del curso evolutivo de la depresión.

Demostrado el efecto de $\alpha 7$ -nAChR y de la subunidad dup $\alpha 7$ en la neurotransmisión, y la conocida implicación de este sistema en la depresión, nos propusimos averiguar si existía relación entre estos transcritos y dicha patología mediante un estudio piloto con pacientes depresivos. Para ello, se procedió al análisis de ARNm de $\alpha 7$ y dup $\alpha 7$ de células de sangre periférica de estos pacientes. Actualmente, a pesar de que la región cromosómica 15q13-q14, en la que se encuentran los genes codificantes para estas subunidades, ha sido asociada a distintas enfermedades psiquiátricas (Christian y col. 1999; Boer y col. 2002; Taske y col. 2002; Hong y col., 2004; Flomen y col., 2006; Leonard y Freedman, 2006; Iwata y col., 2007), solo unos pocos trabajos han investigado la expresión del $\alpha 7$ -nAChR en depresión. Uno de estos trabajos (Kunii y col. 2015), encontró un aumento significativo de $\alpha 7$ ARNm y dup $\alpha 7$ ARNm en muestras de cerebro de pacientes depresivos. Otros estudios han fallado en este sentido, y solo han podido asociar alteraciones en la expresión de $\alpha 7$ -nAChR en pacientes con otras patologías mentales como la depresión bipolar (Thomsen y col. 2011) y la esquizofrenia. En estudios postmortem de cerebros de esquizofrénicos se ha encontrado un menor número de sitios de fijación de α -Bgtx, tanto en cortex prefrontal (Freedman y col. 1995) como en hipocampo (Guan y col. 1999), aunque diferentes estudios han encontrado solo estas diferencias en pacientes fumadores (Mousavi y col. 2003; Mexal y col. 2010). Sí hay una relación, más o menos bien establecida, entre polimorfismos en estos genes o en sus regiones promotoras y endofenotipos típicos de la esquizofrenia, como la onda P50. Este último endofenotipo ha sido asociado fuertemente con la delección de -2pb en el exón 6 del gen *CHRFAM7A* (Raux y col. 2002, Dempster y col. 2006).

Nuestros resultados son los primeros en poder establecer una correlación entre la gravedad de la depresión y los niveles de expresión de $\alpha 7$ ARNm en células de sangre periférica, de tal forma que, la expresión de dicha subunidad nicotínica fueron proporcionalmente inversos a la puntuación obtenida en la escala de Hamiton (Panel A, Fig. 57). Esto indica, de forma contundente, que el control de la inflamación basal presente en estos pacientes conlleva una reducción de los síntomas depresivos y, por tanto, podría establecerse como un posible mecanismo terapéutico. Para ello, la expresión del $\alpha 7$ ARNm podría considerarse como un marcador del curso evolutivo de la enfermedad (Fig. 58). Otros estudios han observado la relación entre la expresión de

mediadores inflamatorios, como la citoquina IL-6, y la respuesta al tratamiento farmacológico (Dowlati y col. 2010; Haapakoski y col. 2015) proponiendo dicha citoquina como posible marcador predictivo de la enfermedad.

A pesar de la destacable función de dup α 7 como modulador negativo del α 7-nAChR a nivel de su actividad en la neurotransmisión, no hemos podido establecer relación entre los niveles de expresión de ARNm de ambas subunidades medido en células de sangre periférica. Tampoco encontramos una asociación directa entre dup α 7 ARNm y la gravedad de la depresión (Panel B, Fig. 57). Bien es cierto que nuestro estudio tiene ciertas limitaciones que podrían estar condicionando estos resultados. Así pues, sería necesario incrementar el número de pacientes depresivos para tener la certeza de que la determinación del nivel de expresión de α 7 puede ser un marcador de pronóstico en la depresión y poder determinar con mayor exhaustividad si los niveles de expresión de dup α 7 ARNm se encuentran involucrados. De esta limitación, se puede extrapolar el porcentaje reducido de pacientes refractarios al tratamiento (16,6 %) presentes en nuestra muestra poblacional respecto a lo observado de manera general en la población de pacientes depresivos (\approx 33 %). Otra limitación resulta del protocolo de seguimiento de los pacientes, mientras que algunos de ellos han podido ser evaluados en 2 o 3 ocasiones, otros solo fueron evaluados en una ocasión, y el tiempo transcurrido entre las visitas fue ligeramente diferente entre los pacientes, obteniendo una media de $4,3 \pm 0,7$ meses de diferencia. Nuestro grupo de pacientes depresivos, con tratamiento farmacológico previo y continuo durante el ensayo, tuvieron unos niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-6 e IL-1 β) y antiinflamatorias (IL-10) ligeramente superiores al grupo control (Tabla 17). Estos datos son concordantes con lo observado por otros autores, donde tras el tratamiento con fármacos antidepresivos observan que los niveles citoquinas proinflamatorias disminuyen (Miller y col. 2009), mientras que los niveles de citoquinas antiinflamatorias aumentan (Kenis y Maes 2002).

5. Un estímulo inflamatorio agudo modifica la expresión de α 7 ARNm en neuronas y microglía lo que podría contribuir a un estado depresivo.

Como se deduce de nuestros resultados en pacientes, la expresión de α 7 ARNm actúa como un marcador predictivo del curso evolutivo de la enfermedad, resaltando la importancia de un buen control de la respuesta inflamatoria en depresión. Este hecho nos

lloevó a plantear, ¿qué sucede en las células del SNC ante un estímulo agudo inflamatorio?, ¿cómo podría interferir en la expresión de las subunidades $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ ARNm en estos tipos celulares para que de ello se precipite la aparición de un estado depresivo?.

Nuestros resultados indican que la expresión de la subunidad $\alpha 7$ ARNm se ve afectada, tanto en SH-SY5Y como en C13NJ, tras diferentes estímulos con citoquinas proinflamatorias (Figs. 60 y 61), produciéndose una reducción en su expresión. Esta inhibición de la expresión $\alpha 7$ ARNm puede contribuir a la explicación de hechos que acontecen en la depresión. Como ya se ha mencionado, el $\alpha 7$ -nAChR contribuye en la liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica, por lo que, una menor expresión de dicho receptor acentuaría el déficit de neurotransmisores que acontecen en la depresión. A su vez, la reducción de $\alpha 7$ -nAChRs presentes en microglía está en concordancia con la actuación de un fenotipo microglial M1, que se activa ante la presencia de un agente lesivo. El aumento de citoquinas proinflamatorias en el medio extracelular podría interpretarse como reflejo de lo que ocurre ante la presencia de un agente lesivo en un sistema completo. Es decir, las células inmunes periféricas responden con un aumento de citoquina proinflamatorias, y esta información es interpretada por las células de microglia en el SNC como presencia de una agresión. Así pues, la microglía pondría en marcha un mecanismo de retroalimentación positiva que generase más citoquinas proinflamatorias en la lucha contra el agente lesivo. Para ello, el sistema antiinflamatorio mediado por los $\alpha 7$ -nAChR tendría que mantenerse inhibido. Siguiendo esta línea de acción, se hace lógica la tendencia observada a aumentar $\text{dup}\alpha 7$ ARNm ante la estimulación con la citoquina proinflamatoria IL-6.

6. Los fármacos antidepresivos modifican la expresión de ARNm de ciertas subunidades nicotínicas en células neuronales y microglía.

Nuestros resultados demuestran que los fármacos antidepresivos pueden estar ejerciendo su efecto, en parte, por mecanismos alternativos a su modo de acción clásico que involucrarían a los nAChRs. Nuestros resultados indican que ciertos fármacos antidepresivos son capaces de modular la expresión del ARNm de las subunidades nicotínicas, tanto en células neuronales como en células de microglía.

Respecto a la acción sobre las subunidades nicotínicas expresadas por las SH-SY5Y, solo el fármaco imipramina consiguió modificar la expresión de $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$

ARNm (Fig. 62). Un aumento en la expresión de $\alpha 7$ ARNm, nos lleva a pensar en el efecto positivo que han demostrado tener los $\alpha 7$ -nAChR en la liberación de diferentes neurotransmisores, incluidas las aminas deficitarias en la depresión (Dani 2001; Dani y Bertrand 2007). El aumento de $\alpha 7$ ARNm podría deberse a un mecanismo protector contra un exceso en el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ que condujese a mecanismos de muerte celular. Así, por ejemplo, una sobreexpresión de $\alpha 7$ -nAChR inducida por la proteína gp120_{IIIB} del VIH ha sido relacionada con los desórdenes neurogénicos de dichos pacientes provocados por la muerte celular, vía $\alpha 7$ -nAChR (Ballester y col. 2012; Ramos y col. 2016). Este efecto de toxicidad por exceso de $[Ca^{2+}]_i$, mediado por $\alpha 7$ -nAChR, ha sido también implicado en procesos de muerte celular durante el desarrollo del sistema nervioso autónomo (Hruska y Nishi 2007). El resto de fármacos no causaron modificaciones en la expresión de las subunidades nicotínicas con excepción de $\alpha 9$ ARNm que sufrió un incremento significativo con el tratamiento de los fármacos imipramina, tranilcipromina y fluoxetina (Fig. 63). Esta subunidad se encuentra implicada en procesos de metástasis mediante la inducción de la proliferación y migración celular (Lee 2010; Hung y col. 2011). Realiza su acción a través de la activación de la ruta de señalización p85, Akt y la activación de receptores de estrógenos (Chih-Hsiung Wu y col. 2011). Estos mismos receptores se encuentran expresados en cerebro, donde promueven la neurogénesis (Heberden 2017) por inducción del factor trófico BDNF (Cavus y Duman 2003).

El efecto de los antidepresivos sobre las C13NJ destaca por la expresión incrementada de $\alpha 7$ ARNm con 3 de los 4 tratamientos (imipramina, tranilcipromina y fluoxetina) (Fig. 62). Los ATC y los IMAO actúan incrementando los niveles cerebrales de NA, junto con otras aminas. En ratones, se ha visto que la inducción de los receptores β -adrenérgicos, vía la activación de la ruta AMPc, PKA, conduce a un aumento de la fosforilación del factor CREB (Thome y col. 2000). Esto, finalmente, implica la inhibición de polarización de la microglía hacia el fenotipo M1, conduciendo a una inhibición en la transcripción de citoquinas proinflamatorias (Christiansen y col. 2011). El incremento en la expresión de $\alpha 7$ ARNm, a través de estos fármacos, podría reforzar el efecto antidepresivo. Está descrito que la activación del $\alpha 7$ -nAChR hace virar la microglía hacia su fenotipo M2 y, así, inhibir la inflamación (Borovikova y col. 2000; Shytle y col. 2004; Wang y col. 2004, Parada y col. 2013; egea y col. 2015). Realiza esta

acción por activación de rutas de señalización JAK-STAT3 (Shaw y col. 2002, Maldifassi y col. 2014), que promueve de forma directa un efecto antiinflamatorio y, por otro lado, la inhibición de GSK3 β , potenciando de esta manera a Nfr2 y CREB. La microglía también expresa receptores 5HT7 (Mahe y col. 2005), así pues, los inhibidores de recaptación de monoaminas también contribuirían a este fenotipo antiinflamatorio a través de dicha ruta (AMPC, PKA, CREB) (Kalman y Feuerbach 2016).

Sin embargo, en el control de la inflamación parecen involucrarse otros subtipos de receptores nicotínicos diferentes a $\alpha 7$ -nAChR (Hao y col. 2001). Nuestros datos muestran un incremento considerable en la expresión de $\alpha 9$ ARNm en células C13NJ (Fig. 63). Esta subunidad está expresada en microglía, monocitos y células dendríticas (Hao y col. 2001). Se ha observado como $\alpha 9$ -nAChR es capaz de promover la reclutación de monocitos hacia macrófagos para responder ante un estímulo inflamatorio (IFN γ), sugiriendo el papel de $\alpha 9$ -nAChR en la disminución del número de monocitos M1 (St-Pierre y col. 2016) y, por tanto, en los procesos inflamatorios. Por el contrario, otros autores revelan la posibilidad de un papel pro-inflamatorio endógeno de los $\alpha 9$ -nAChRs (Vincler y col. 2007; Simard y col. 2013). No se ha identificado la expresión de $\alpha 4$ ARNm en células de microglía humana (Rock y col. 2008), por lo que, entre los receptores heteroméricos destacarían los $\alpha 3^*$ -nAChR. Nuestros resultados indican un efecto del tratamiento con imipramina sobre la expresión de $\alpha 3$, $\beta 2$ y $\beta 4$ ARNms (Fig. 63). La subunidad $\alpha 3$ es expresada por diferentes células de tipo inmune, neutrófilos (Safronova y col. 2016), leucocitos (Chernyavsky y col. 2009) donde ha sido involucrada en procesos inmunes y antiinflamatorios.

El efecto antidepresivo de ciertos fármacos ha sido asociado a la capacidad que muestran algunos de ellos para incrementar la proliferación celular en ciertas áreas cerebrales. Se ha observado como el fármaco IMAO, tranilcipromina, incrementa la proliferación celular, tanto en cerebro de ratones (Malberg y col. 2000) como en peces (Romanczyk y col. 2014) tras su adición durante periodos cortos de tiempo. Nuestros resultados reflejan este efecto en los experimentos *in vitro* en células de neuroblastoma que, desde las primeras 24 h de incubación, incrementan su proliferación (Tabla 18). Nuestros resultados también apuntan a un posible efecto de fluoxetina sobre la proliferación celular. Diferentes estudios han observado un incremento en la proliferación de células neuronales en hipocampo de ratón y rata tras el tratamiento con fluoxetina

(Malberg y col. 2000; Faillace y col. 2015; Zhou y col. 2016). Pero en estos trabajos el incremento en la proliferación celular, y su consecuencia comportamental, fue producido tras tratamientos crónicos con el antidepresivo.

Conclusiones

Las principales conclusiones de este trabajo se resumen en los siguientes puntos:

1. Células de mamíferos, de tipo neuroendocrino, inmune o neuronal, son capaces de formar un receptor nicotínico mixto con la subunidad $\alpha 7$ ($\alpha 7$ dup $\alpha 7$ -nAChR) en detrimento de la formación de $\alpha 7$ -nAChR homoméricos.
2. La incorporación de dup $\alpha 7$ a la estructura pentamérica del nAChR reduce el transporte del mismo desde el RE a la membrana y, por tanto, sus niveles de expresión en esta estructura celular.
3. La sobreexpresión de dup $\alpha 7$ reduce la señal de $[Ca^{2+}]_i$ y la neurosecreción mediada por el $\alpha 7$ -nAChR a nivel neuronal.
4. El $\alpha 7$ dup $\alpha 7$ -nAChR mixto tiene menor capacidad funcional que el $\alpha 7$ -nAChR homomérico.
5. Nuestro estudio en pacientes depresivos muestra, por primera vez, una correlación inversa entre los niveles de $\alpha 7$ ARNm determinados en células sanguíneas y la gravedad de la depresión (Escala Hamilton).
6. La expresión del $\alpha 7$ ARNm, tanto en neuronas como en microglía, resulta modulable por estímulos inflamatorios, como son las citoquinas proinflamatorias. Sobre las neuronas, este efecto puede conllevar una disminución en los niveles de neurotransmisores, mientras que, sobre la microglía, podría conducir a una retroalimentación positiva de la inflamación. Ambas acciones conjuntas promoverían el estado depresivo.
7. Algunos fármacos antidepresivos aumentan la expresión de $\alpha 7$ ARNm en neuronas (imipramina) y/o microglía (imipramina, tranilcipromina y fluoxetina). Este efecto puede conducir a una mayor liberación de neurotransmisores y una disminución de la neuroinflamación, lo cual puede contribuir a la acción antidepresiva de estos fármacos.

Anexos

ANEXO 1

TEORÍA EVOLUTIVA DEL ORIGEN DE LA DEPRESIÓN COMO DEFENSA ANTE LOS PROCESOS INFECCIOSOS.

En la actualidad, la depresión representa el trastorno afectivo más prevalente en la población. Esta enfermedad conlleva una alta comorbilidad con otras patologías que comprometen la supervivencia del individuo. Según, la teoría evolutiva, solo las características que suponen una ventaja en la supervivencia de los individuos, perdurarán a lo largo de la evolución de la especie. Por tanto, ¿Cómo es posible que una enfermedad con tales inconvenientes haya alcanzado tal prevalencia? ¿Acaso la depresión representa un mecanismo evolutivamente ventajoso para la especie humana?.

En 1999, Kinney y Tanaka propusieron la hipótesis del origen evolutivo de la depresión como una defensa contra infecciones. Unos años después, en 2012, Raison y Miller la denominaron hipótesis de la defensa del huésped contra el patógeno (PATHOS-D). Ambas apenas difieren entre sí, exceptuando en el grado de involucración que predicen entre la depresión y el sistema inmune.

Estas hipótesis desarrollan la idea de que, la vulnerabilidad de un individuo ante contraer infecciones produce un estado de ánimo deprimido, el cual a su vez, desencadena comportamientos que ayudarán a protegerse a sí mismo y a sus congéneres de nuevas infecciones.

Las premisas que sustentan estas hipótesis son:

- La mayoría de los síntomas de la depresión ayudan al sistema inmune a luchar contra la infección a través de 1) conservar las fuentes metabólicas, 2) mejorar la función inmune a través de mecanismos antimicrobianos, 3) reducir el riesgo de contacto con factores ambientales estresantes y 4) evitar la transmisión de la enfermedad a otros individuos.

Síntomas como la fatiga, la anhedonia, el letargo locomotor y la falta de actividad física (American Psychiatric Association 2000) fomentan el descanso y, por tanto, la conservación de fuentes metabólicas para un mejor funcionamiento del sistema inmune. Además, este hecho hace que se reduzca la exposición a nuevos

agentes infecciosos, que comprometan, aún más, el sistema inmune del individuo. Por el contrario, algunos pacientes depresivos presentan ansiedad, agitación e insomnio, constituyendo un estado de hipervigilancia. Este estado permitiría a nuestros ancestros estar alerta ante la amenaza de depredadores que pudiesen causar daños al propio individuo o al resto del grupo (Marks y Nesse 1994). Los cambios en el estado de ánimo, como la falta de deseo sexual y la irritabilidad, reducen el contacto con otros individuos, consecuentemente, disminuyen el riesgo de transmisión de enfermedades (Thwaites y col. 1997). Los cambios en el apetito son un rasgo común en la depresión (American Psychiatric Association 2000). Según los autores de esta hipótesis evolutiva, estos cambios constituyen una estrategia alternativa para reducir la probabilidad de nuevas infecciones por ingesta de parásitos con la comida (Mead y col. 1999). O por el contrario, la ingesta máxima de carbohidratos que conduce a un estado inflamatorio mediado por el incremento en la actividad de células “*Natural Killer*” (Braun y Von Duvillard 2004).

- La existencia de comorbilidad entre depresión y muchas enfermedades infecciosas (Fazekas 2006; Murray 2007). Los pacientes depresivos presentan elevadas tasas de infección (Irwin y col. 2002b). Diferentes estudios indican que los pacientes depresivos presentan una vulnerabilidad incrementada a contraer infecciones respiratorias (Cohen y col. 1995), infecciones por herpes simplex (Zorrilla y col. 1996) y por varicela zoster (Irwin y col. 2002b). Se ha descrito una fuerte asociación entre la depresión y la reducida actividad de las células inmunes “*Natural Killer*” (Zorrilla y col. 2001; Reiche y col. 2004) y un aumento en los mediadores inflamatorios (Irwin y Miller 2007; Dowlati 2010).
- Condiciones patológicas, ambientales y psicológicas que incrementa la vulnerabilidad inmune están asociadas a mayores tasas de depresión (Sillaber y col. 2009). Entre ellas, se encuentran el estrés psicológico y la privación de sueño (Lustberg y Reynolds 2000). Ambas condiciones promueven la inmunosupresión del sistema inmune (Weiss y Michael 2004; Irwin 2002a).
- La comunicación bidireccional que existe entre el SNC y el sistema inmune proporciona mecanismos que influyen de manera recíproca.

La alta comorbilidad y mortalidad de la depresión parece contradecir la ventaja evolutiva que presentaría el comportamiento depresivo. Sin embargo, estos autores resaltan que, en el curso evolutivo de cualquier enfermedad, solo se requiere que las ventajas relativas que presenta sobrepasen a los perjuicios que provoca. A lo largo de la evolución humana, las infecciones han tenido un gran impacto en el desarrollo de la especie. Por lo que, los cambios comportamentales de la depresión representaban una mecanismo de defensa que incrementaba la supervivencia del individuo. Hay que tener en cuenta que el tiempo de vida media de nuestros ancestros era muy inferior al actual y, por tanto, estos cambios se mantenían a corto-medio plazo. Sin embargo, actualmente, el tiempo de vida media ha incrementado considerablemente y, solo ahora, es posible evaluar los daños producidos por la alteración, a largo plazo, del sistema inmune y del comportamiento social.

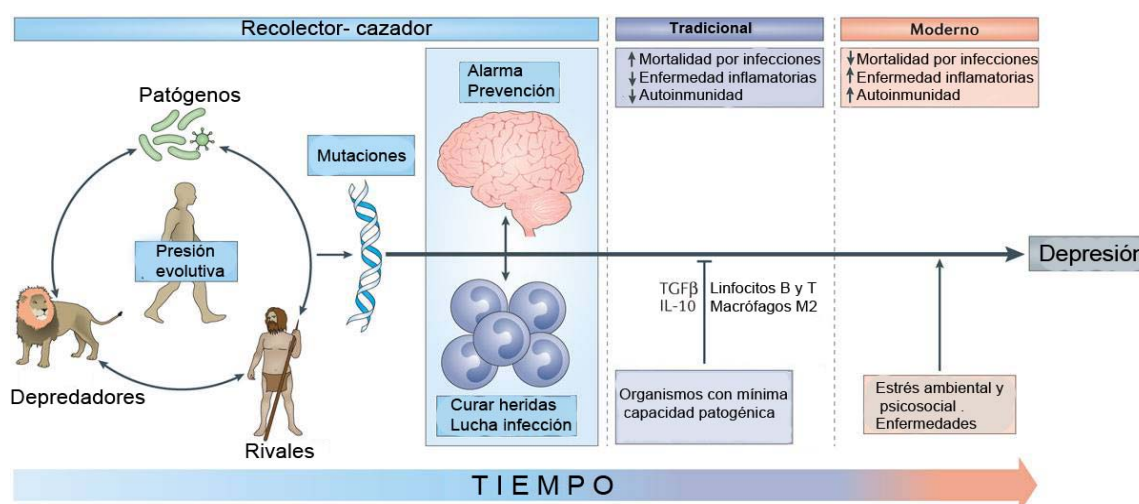


Figura: La depresión como legado evolutivo de la inflamación. La presión evolutiva derivada de las interacciones humanas con patógenos, depredadores y otros congéneres (rivales) resultó en la selección de la inflamación como una vía contra infecciones, a través de una respuesta que integra cambios comportamentales e inmunes, que permitiesen conservar la energía corporal para la supervivencia. Este hecho parece que ha estado bajo control a lo largo de la evolución por la exposición a estos "peligros". En la actualidad, estos factores de presión evolutiva han desaparecido pero han emergido otros como resultado del modo de vida que han permitido mantener la selección positiva sobre este mecanismo. Adaptado de (Miller y Raison 2016).

De forma general, estas hipótesis postulan un papel protector de la depresión frente a infecciones en la evolución del ser humano. En la sociedad moderna, los tratamientos antimicrobianos y la salubridad han reducido las tasas de mortalidad asociadas a infección, de modo que las ventajas relativas que presenta la depresión

pueden resultar prescindibles. Sin embargo, en la actualidad, los seres humanos nos enfrentamos a otros estímulos dañinos, como el estrés, principal factor desencadenante de esta patología.

ANEXO 2

ESCALA DE HAMILTON DE 17 ITEMS PARA LA DEPRESIÓN.

Ítems	Criterios operativos de valoración
1. Humor deprimido (tristeza, depresión, desamparo, intensidad)	0. Ausente 1. Estas sensaciones se indican solamente al ser preguntado. 2. Estas sensaciones se relatan oral y espontáneamente. 3. Sensaciones no comunicadas verbalmente, es decir, por la expresión facial, la postura, la voz y la tendencia al llanto. 4. El paciente manifiesta estas sensaciones en su comunicación verbal y no verbal de forma espontánea.
2. Sensación de culpabilidad	0. Ausente 1. Se culpa a sí mismo, cree haber decepcionado a la gente. 2. Ideas de culpabilidad, o meditación sobre errores pasados o malas acciones. 3. La enfermedad actual es un castigo. Ideas delirantes de culpabilidad. 4. Oye voces acusatorias o de denuncia y/o experimenta alucinaciones visuales Amenazadoras.
3. Suicidio	0. Ausente 1. Le parece que la vida no merece la pena ser vivida. 2. Desearía estar muerto o tiene pensamientos sobre la posibilidad de morirse. 3. Ideas de suicidio o amenazas. 4. Intentos de suicidio (cualquier intento serio se califica 4).
4. Insomnio precoz	0. Ausente 1. Dificultades ocasionales para dormirse, por ejemplo, más de media hora. 2. Dificultades para dormirse cada noche.
5. Insomnio medio	0. Ausente 1. El paciente se queja de estar inquieto durante la noche. 2. Está despierto durante la noche; cualquier ocasión de levantarse de la cama se califica 2 (excepto si está justificada: orinar, tomar o dar medicación, etc.).
6. Insomnio tardío	0. Ausente 1. Se despierta a primeras horas de la madrugada pero vuelve a dormirse. 2. No puede volver a dormirse si se levanta de la cama.
7. Trabajo y actividades	0. Ausente 1. Ideas y sentimientos de incapacidad. Fatiga o debilidad relacionadas con su actividad, trabajo o aficiones 2. Pérdida de interés en su actividad, aficiones, o trabajo, manifestado directamente por el enfermo o indirectamente por desatención, indecisión y vacilación. 3. Disminución del tiempo dedicado a actividades o descenso en la productividad. 4. Dejó de trabajar por la presente enfermedad.
8. Inhibición (lentitud de pensamiento y de la palabra, empeoramiento de la concentración, actividad motora disminuida)	0. Palabra y pensamiento normales. 1. Ligero retraso en el diálogo. 2. Evidente retraso en el diálogo 3. Diálogo difícil. 4. Torpeza absoluta.
9. Agitación	0. Ninguna 1. "Juega" con sus manos, cabellos, etc. 2. Se retuerce las manos, se muerde las uñas, los labios, se tira de los cabellos, etc.
10. Ansiedad psíquica	0. No hay dificultad 1. Tensión subjetiva e irritable. 2. Preocupación por pequeñas cosas. 3. Actitud aprensiva aparente en la expresión o en el habla. 4. Terrores expresados sin preguntarle.

11. Ansiedad somática	0. Ausente 1. Ligera 2. Moderada 3. Grave 4. Incapacitante Signos fisiológicos concomitantes de la ansiedad como: ~ Gástricos: boca seca, flatulencia, diarrea, eructos, retortijones ~ Cardiovasculares: palpitaciones, cefalalgias ~ Respiratorios: Hiperventilación suspiros ~ Frecuencia urinaria ~ Sudoración
12. Síntomas somáticos gastrointestinales	0. Ninguno 1. Pérdida de apetito, pero come sin necesidad de que estimulen. Sensación de pesadez en el abdomen. 2. Dificultad en comer sino se le insiste. Solicita o necesita laxantes o medicación intestinal para sus síntomas gastrointestinales
13. Síntomas somáticos generales	0. Ninguno 1. Pesadez en las extremidades, espalda o cabeza. Dorsalgias, cefalalgias, algias musculares. Pérdida de energía y fatigabilidad. 2. Cualquier síntoma bien definido se califica 2.
14. Síntomas genitales	0. Ausente 1. Débil 2. Grave 3. Incapacitante Síntomas como ~ Pérdida de la libido ~ Trastornos menstruales
15. Hipocondría	0. No la hay 1. Preocupado de sí mismo (corporalmente). 2. Preocupado por su salud. 3. Se lamenta constantemente, solicita ayudas, etc. 4. Ideas delirantes hipocondríacas.
16. Pérdida de peso (completar A o B)	A. Según manifestaciones del paciente (primera evaluación) 0. No hay pérdida de peso 1. Probable pérdida de peso asociada con la enfermedad actual. 2. Pérdida de peso definida (según el enfermo). B. Según pesaje hecho por el psiquiatra (evaluaciones siguientes) 0. Pérdida de peso inferior a 500 g en una semana. 1. Pérdida de peso de más de 500 g en una semana. 2. Pérdida de peso de más de 1 kg en una semana (por término medio).
17. <i>Insight</i> (conciencia de enfermedad)	0. Se da cuenta de que está deprimido y enfermo. 1. Se da cuenta de su enfermedad pero atribuye la causa a la mala alimentación, clima, exceso de trabajo, virus, etc. 2. Niega que esté enfermo.

Tomado de: Ramos-Brieva J, Cordero Villafafi la A. Validación de la versión castellana de la escala Hamilton para la depresión. Actas Luso Esp Neurol Psiquiatr Cienc Afines 1986;14:324-34).

ANEXO 3: Datos clínicos de los pacientes depresivos.

Paciente	año comienzo	nº episodios	Tratamiento al inicio del estudio	1ª Visita		2ª Visita		3ª Visita	
				Hamilton	Cambio de tratamiento	Hamilton	Cambio de tratamiento	Hamilton	Cambio de tratamiento
1	1992	3	Venlafaxina 75 mg, paroxetina 20 mg, lamotrigina 50 mg	7	Venlafaxina 75 mg, paroxetina 20 mg, lamotrigina 50 mg	15	Paroxetina 20 mg, lamotrigina 100 mg	19	seroxat 10
2	2006	6	Venlafaxina 75 mg, paroxetina 20 mg, lamotrigina 50 mg	20	Venlafaxina 75 mg, paroxetina 20 mg, lamotrigina 50 mg	4	Nafranil 75, Quetiapina 25 mg		
3	2004	3	Paroxetina 20 mg, Lamotrigina 100 mg	16	Venlafaxina 75 mg, paroxetina 40 mg, lamotrigina 50 mg	0	Paroxetina 20 mg, Lamotrigina 100 mg	19	Paroxetina 20 mg, Lamotrigina 100 mg
4	2011	5	Paroxetina 20 mg, Lamotrigina 100 mg	15	Duloxetina 75mg, Lamotrigina 50 mg	6	Duloxetina 30 Lamotrigina 50 mg		
5	1992	10	Duloxetina 75mg, Lamotrigina 50 mg	9	Duloxetina 75mg, Lamotrigina 50 mg	8	Duloxetina 75mg, Lamotrigina 100 mg	2	Duloxetina 75mg, Lamotrigina 50 mg
6	2008	3	Elontril 300mg/d, mirtazapina 15 mg/d	24	Elontril 300mg/d, mirtazapina 15 mg/d	18	Elontril 300mg/d, mirtazapina 15 mg/d	12	Elontril 150 mg mirtazapina 7,5 mg/d
7	2013	1	Escitalopram 10 mg/d Lorazepam 1 mg/d	8	Escitalopram 10 mg/d Lorazepam 1 mg/d	12	Loracepan 1 mg no cumple tratamiento		
8	2008	5	escitalopram 20 mg	22	Duloxetina 75mg, Lamotrigina 50 mg	13	Duloxetina 75mg, Lamotrigina 50 mg Escitalopram 20 mg	8	Besitrán 100 mg, Seroquel 100 mg
9	1996	3	Escitalopram 30 mg/d	20	Escitalopram 30 mg/d	18	Escitalopram 30 mg/d	18	Escitalopram 30 mg/d
10	2002	5	Sertralina 100 mg/d, Lorazepam 1 mg s/p, Zolpidem 10 mg s/p	20	Duloxetina 75 mg Escitalopram 20 mg	3	Duloxetina 100 mg Escitalopram 30 mg	10	Escitalopram 10 mg/día
11	2006	4	Duloxetina 120, trazodona 100,	21	Duloxetina 75mg, Lamotrigina 50 mg	5	Duloxetina 120, trazodona 100, duloxetina 90,	4	Duloxetina 60, trazodona 50,
12	2010	4	escitalopram 20 mg	19	Duloxetina 75mg, Lamotrigina 50 mg	11	escitalopram 20, abilify 10, quetiapina 300		
13	2009	3	Paroxetina 40 mg	24	Duloxetina 75mg, Lamotrigina 50 mg	5	Escitalopram 20 mg/d mirtazapina 15 mg/día		
14	2010	2	Paroxetina 20,	23	Paroxetina 20,	4	Paroxetina 20,		
15	2001	3	Duloxetina 120 mg,	11	Duloxetina 120 mg,	17	Duloxetina 120 mg, Lamotrigina 50 mg		
16	2010	2	Duloxetina 120 mg, Lamotrigina 50 mg	13	Duloxetina 120 mg, Lamotrigina 50 mg	15	Duloxetina 120 mg, Lamotrigina 75 mg		
17	2004	8	Duloxetina 75mg, Lamotrigina 50 mg	12	Duloxetina 75mg, Lamotrigina 50 mg	14	Duloxetina 100mg, Lamotrigina 50 mg	16	Duloxetina 100mg, Lamotrigina 100 mg
18	2003	2	Sertralina 100 mg/d, Lorazepam 1 mg s/p, Zolpidem 10 mg s/p	6	Sertralina 100 mg/d, Lorazepam 1 mg s/p, Zolpidem 10 mg s/p				
19	2007	3	Escitalopram 15 mg/d	16	Escitalopram 15 mg/d				
20	2007	3	Sertralina 100 mg/d, Duloxetina 100 mg	20	Sertralina 100 mg/d, Duloxetina 100 mg Lorazepam 1 mg s/p,	6	Sertralina 100 mg/d, Duloxetina 100 mg Lorazepam 1 mg s/p,		
21	2008	8	Sertralina 100 mg/d, Duloxetina 100 mg	21	Sertralina 100 mg/d, Duloxetina 100 mg Lorazepam 1 mg s/p,	24	Duloxetina 100 mg/d,		
22	2011	4	Escitalopram 40 mg	4	Duloxetina 100 mg/d,				
23	2012	4	Duloxetina 120 mg, Lamotrigina 50 mg	5	Duloxetina 120 mg, Lamotrigina 50 mg				
24	1985	3	clorimipramina 225, lamotrigina 200, bupropion 150, mirtazapina 15	16	clorimipramina 225, lamotrigina 200, bupropion 150, mirtazapina 15	6	anafranil 37,5, mirtazapina 15, elontril 150, lamictal 200, quetiapina, 100		

BIBLIOGRAFÍA

A. L. L. Galesi W. M. S. C. Tamashiro and A. M. Moraes. The Effect of Medium Compostion on Interleukin-2 Production by Murine EL-4 Thymoma Cells. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2004, vol. 21, no. 02, pp. 165-173.

ABBASI, S. H., et al. Effect of Celecoxib Add-on Treatment on Symptoms and Serum IL-6 Concentrations in Patients with Major Depressive Disorder: Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Journal of Affective Disorders*, 20120418, Dec 10, 2012, vol. 141, no. 2-3, pp. 308-314. ISSN 1573-2517; 0165-0327.

ABDEL-SALAM, O. M.; BAIUOMY, A. R. and ARBID, M. S. Studies on the Anti-Inflammatory Effect of Fluoxetine in the Rat. *Pharmacological Research*, Feb, 2004, vol. 49, no. 2, pp. 119-131. ISSN 1043-6618; 1043-6618.

AKHONDZADEH, S., et al. Clinical Trial of Adjunctive Celecoxib Treatment in Patients with Major Depression: A Double Blind and Placebo Controlled Trial. *Depression and Anxiety*, 2009, vol. 26, no. 7, pp. 607-611. ISSN 1520-6394; 1091-4269.

AKIRA, S.; and TAKEDA, K. Toll-Like Receptor Signalling. *Nature Reviews. Immunology*, Jul, 2004, vol. 4, no. 7, pp. 499-511. ISSN 1474-1733; 1474-1733.

ALBONI, S., et al. N-Acetyl-Cysteine Prevents Toxic Oxidative Effects Induced by IFN-Alpha in Human Neurons. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 20130416, Sep, 2013, vol. 16, no. 8, pp. 1849-1865. ISSN 1469-5111; 1461-1457.

ALBONI, S., et al. Fluoxetine Treatment Affects the Inflammatory Response and Microglial Function According to the Quality of the Living Environment. *Brain, Behavior, and Immunity*, 20160727, Nov, 2016, vol. 58, pp. 261-271. ISSN 1090-2139; 0889-1591.

ALBUQUERQUE, E. X., et al. Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, Jan, 2009, vol. 89, no. 1, pp. 73-120. ISSN 0031-9333; 0031-9333.

ALBUQUERQUE, E. X., et al. Neuronal Nicotinic Receptors in Synaptic Functions in Humans and Rats: Physiological and Clinical Relevance. *Behavioural Brain Research*, Aug, 2000, vol. 113, no. 1-2, pp. 131-141. ISSN 0166-4328; 0166-4328.

ALDER, N. N.; and JOHNSON, A. E. Cotranslational Membrane Protein Biogenesis at the Endoplasmic Reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 20040317, May 28, 2004, vol. 279, no. 22, pp. 22787-22790. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

ALEXANDER, J. K., et al. Ric-3 Promotes Alpha7 Nicotinic Receptor Assembly and Trafficking through the ER Subcompartment of Dendrites. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Jul 28, 2010, vol. 30, no. 30, pp. 10112-10126. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

ALKONDON, M., et al. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Activation Modulates Gamma-Aminobutyric Acid Release from CA1 Neurons of Rat Hippocampal Slices. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Dec, 1997, vol. 283, no. 3, pp. 1396-1411. ISSN 0022-3565; 0022-3565.

Amalia García – Delgado Morente y Miguel Ángel Gastelurrutia. *Guía De Seguimiento Farmacoterapeutico Sobre Depresion*.

ANDERS, S.; TANAKA, M. and KINNEY, D. K. Depression as an Evolutionary Strategy for Defense Against Infection. *Brain, Behavior, and Immunity*, 20121220, Jul, 2013, vol. 31, pp. 9-22. ISSN 1090-2139; 0889-1591.

ANDERSON, R. J., et al. The Prevalence of Comorbid Depression in Adults with Diabetes: A Meta-Analysis. *Diabetes Care*, Jun, 2001, vol. 24, no. 6, pp. 1069-1078. ISSN 0149-5992; 0149-5992.

ANDREASEN, J. T.; REDROBE, J. P. and NIELSEN, E. O. Combined Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonism and Partial Serotonin Transporter Inhibition Produce Antidepressant-Like Effects in the Mouse Forced Swim and Tail Suspension Tests: A Comparison of SSR180711 and PNU-282987. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 20111113, Jan, 2012, vol. 100, no. 3, pp. 624-629. ISSN 1873-5177; 0091-3057.

ANDREASEN, J. T., et al. A Combined Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist and Monoamine Reuptake Inhibitor, NS9775, Represents a Novel Profile with Potential Benefits in Emotional and Cognitive Disturbances. *Neuropharmacology*, 20130604, Oct, 2013, vol. 73, pp. 183-191. ISSN 1873-7064; 0028-3908.

ANISMAN, H. Inflaming Depression. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, Sep, 2011, vol. 36, no. 5, pp. 291-295. ISSN 1488-2434; 1180-4882.

ARAUD, T., et al. The Chimeric Gene CHRFAM7A, a Partial Duplication of the CHRNA7 Gene, is a Dominant Negative Regulator of alpha7*nAChR Function. *Biochemical Pharmacology*, 20110628, Oct 15, 2011, vol. 82, no. 8, pp. 904-914. ISSN 1873-2968; 0006-2952.

ARIDON, P., et al. Increased Sensitivity of the Neuronal Nicotinic Receptor Alpha 2 Subunit Causes Familial Epilepsy with Nocturnal Wandering and Ictal Fear. *American Journal of Human Genetics*, 20060626, Aug, 2006, vol. 79, no. 2, pp. 342-350. ISSN 0002-9297; 0002-9297.

ARMISHAW, C. J., et al. A Synthetic Combinatorial Strategy for Developing Alpha-Conotoxin Analogs as Potent Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Antagonists. *The Journal of Biological Chemistry*, 20091109, Jan 15, 2010, vol. 285, no. 3, pp. 1809-1821. ISSN 1083-351X; 0021-9258.

ARREDONDO, J., et al. Receptor-Mediated Tobacco Toxicity: Cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 Pathways Downstream of Alpha7 Nicotinic Receptor in Oral Keratinocytes. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Oct, 2006, vol. 20, no. 12, pp. 2093-2101. ISSN 1530-6860; 0892-6638.

ARUN, P., et al. Antipsychotic Drugs Increase N-Acetylaspartate and N-Acetylaspartylglutamate in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Journal of Neurochemistry*, 20080628, Aug, 2008, vol. 106, no. 4, pp. 1669-1680. ISSN 1471-4159; 0022-3042.

ASMUTH, D. M., et al. Safety, Tolerability, and Mechanisms of Antiretroviral Activity of Pegylated Interferon Alfa-2a in HIV-1-Monoinfected Participants: A Phase II Clinical Trial. *The Journal of Infectious Diseases*, Jun 1, 2010, vol. 201, no. 11, pp. 1686-1696. ISSN 1537-6613; 0022-1899.

AZAM, L.; and MCINTOSH, J. M. Alpha-Conotoxins as Pharmacological Probes of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Acta Pharmacologica Sinica*, 20090518, Jun, 2009, vol. 30, no. 6, pp. 771-783. ISSN 1745-7254; 1671-4083.

BAGDAS, D., et al. The Role of Alpha5 Nicotinic Acetylcholine Receptors in Mouse Models of Chronic Inflammatory and Neuropathic Pain. *Biochemical Pharmacology*, 20150428, Oct 15, 2015, vol. 97, no. 4, pp. 590-600. ISSN 1873-2968; 0006-2952.

BAJBOUJ, M., et al. Two-Year Outcome of Vagus Nerve Stimulation in Treatment-Resistant Depression. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, Jun, 2010, vol. 30, no. 3, pp. 273-281. ISSN 1533-712X; 0271-0749.

BALLESTERO, J. A., et al. Effects of Quinine, Quinidine, and Chloroquine on alpha9alpha10 Nicotinic Cholinergic Receptors. *Molecular Pharmacology*, 20050613, Sep, 2005, vol. 68, no. 3, pp. 822-829. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

BARNARD, E. A., et al. Binding of Alpha-Bungarotoxin and Cholinergic Ligands to Acetylcholine Receptors in the Membrane of Skeletal Muscle. *Cell Biology International Reports*, Jan, 1977, vol. 1, no. 1, pp. 99-106. ISSN 0309-1651; 0309-1651.

BAYER, T. A., et al. Evidence for Activation of Microglia in Patients with Psychiatric Illnesses. *Neuroscience Letters*, Aug 20, 1999, vol. 271, no. 2, pp. 126-128. ISSN 0304-3940; 0304-3940.

BENFANTE, R., et al. Expression of the Alpha7 nAChR Subunit Duplicate Form (CHRFAM7A) is Down-Regulated in the Monocytic Cell Line THP-1 on Treatment with LPS. *Journal of Neuroimmunology*, Jan, 2011, vol. 230, no. 1-2, pp. 74-84. ISSN 1872-8421; 0165-5728.

BENOIT, M.; DESNUES, B. and MEGE, J. L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, Sep 15, 2008, vol. 181, no. 6, pp. 3733-3739. ISSN 1550-6606; 0022-1767.

BERNIK, T. R., et al. Cholinergic Antiinflammatory Pathway Inhibition of Tumor Necrosis Factor during Ischemia Reperfusion. *Journal of Vascular Surgery*, Dec, 2002, vol. 36, no. 6, pp. 1231-1236. ISSN 0741-5214; 0741-5214.

BERTRAND, D.; BALLIVET, M. and RUNGGER, D. Activation and Blocking of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Reconstituted in Xenopus Oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Mar, 1990, vol. 87, no. 5, pp. 1993-1997. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

BERTRAND, D.; and GOPALAKRISHNAN, M. Allosteric Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Biochemical Pharmacology*, 20070714, Oct 15, 2007, vol. 74, no. 8, pp. 1155-1163. ISSN 0006-2952; 0006-2952.

BETZ, W. J.; MAO, F. and SMITH, C. B. Imaging Exocytosis and Endocytosis. *Current Opinion in Neurobiology*, Jun, 1996, vol. 6, no. 3, pp. 365-371. ISSN 0959-4388; 0959-4388.

BIEDLER, J. L., et al. Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Research*, Nov, 1978, vol. 38, no. 11 Pt 1, pp. 3751-3757. ISSN 0008-5472; 0008-5472.

BIELECKA, A. M.; and OBUCHOWICZ, E. Antidepressant Drugs can Modify Cytotoxic Action of Temozolomide. *European Journal of Cancer Care*, 20160802, Aug 2, 2016. ISSN 1365-2354; 0961-5423.

BINA, K. G.; RUSAK, B. and SEMBA, K. Localization of Cholinergic Neurons in the Forebrain and Brainstem that Project to the Suprachiasmatic Nucleus of the Hypothalamus in Rat. *The Journal of Comparative Neurology*, Sep 8, 1993, vol. 335, no. 2, pp. 295-307. ISSN 0021-9967; 0021-9967.

BLOUNT, P.; SMITH, M. M. and MERLIE, J. P. Assembly Intermediates of the Mouse Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor in Stably Transfected Fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, Dec, 1990, vol. 111, no. 6 Pt 1, pp. 2601-2611. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

BOLDRINI, M., et al. Hippocampal Angiogenesis and Progenitor Cell Proliferation are Increased with Antidepressant use in Major Depression. *Biological Psychiatry*, 20120530, Oct 1, 2012, vol. 72, no. 7, pp. 562-571. ISSN 1873-2402; 0006-3223.

BOLDRINI, M., et al. Antidepressants Increase Neural Progenitor Cells in the Human Hippocampus. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 20090715, Oct, 2009, vol. 34, no. 11, pp. 2376-2389. ISSN 1740-634X; 0893-133X.

BOLTE, S.; and CORDELIERES, F. P. A Guided Tour into Subcellular Colocalization Analysis in Light Microscopy. *Journal of Microscopy*, Dec, 2006, vol. 224, no. Pt 3, pp. 213-232. ISSN 0022-2720; 0022-2720.

BOORMAN, J. P., et al. The Effects of Beta3 Subunit Incorporation on the Pharmacology and Single Channel Properties of Oocyte-Expressed Human alpha3beta4 Neuronal Nicotinic Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 20030811, Nov 7, 2003, vol. 278, no. 45, pp. 44033-44040. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

BORLAND, L. M.; and MICHAEL, A. C. Voltammetric Study of the Control of Striatal Dopamine Release by Glutamate. *Journal of Neurochemistry*, Oct, 2004, vol. 91, no. 1, pp. 220-229. ISSN 0022-3042; 0022-3042.

BOROVIKOVA, L. V., et al. Role of Vagus Nerve Signaling in CNI-1493-Mediated Suppression of Acute Inflammation. *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical*, Dec 20, 2000a, vol. 85, no. 1-3, pp. 141-147. ISSN 1566-0702; 1566-0702.

BOROVIKOVA, L. V., et al. Vagus Nerve Stimulation Attenuates the Systemic Inflammatory Response to Endotoxin. *Nature*, May 25, 2000b, vol. 405, no. 6785, pp. 458-462. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

BORRONI, V., et al. Cholesterol Depletion Activates Rapid Internalization of Submicron-Sized Acetylcholine Receptor Domains at the Cell Membrane. *Molecular Membrane Biology*, Jan-Feb, 2007, vol. 24, no. 1, pp. 1-15. ISSN 0968-7688; 0968-7688.

BOUMA, E. M., et al. Stressful Life Events and Depressive Problems in Early Adolescent Boys and Girls: The Influence of Parental Depression, Temperament and Family Environment. *Journal of Affective Disorders*, 20070614, Jan, 2008, vol. 105, no. 1-3, pp. 185-193. ISSN 0165-0327; 0165-0327.

BOWER, J. E., et al. Fatigue and Proinflammatory Cytokine Activity in Breast Cancer Survivors. *Psychosomatic Medicine*, Jul-Aug, 2002, vol. 64, no. 4, pp. 604-611. ISSN 0033-3174; 0033-3174.

BRAMON, E., et al. Meta-Analysis of the P300 and P50 Waveforms in Schizophrenia. *Schizophrenia Research*, Oct 1, 2004, vol. 70, no. 2-3, pp. 315-329. ISSN 0920-9964; 0920-9964.

BRILEY, M. S.; and CHANGEUX, J. P. Isolation and Purification of the Nicotinic Acetylcholine Receptor and its Functional Reconstitution into a Membrane Environment. *International Review of Neurobiology*, 1977, vol. 20, pp. 31-63. ISSN 0074-7742; 0074-7742.

BROADBENT, S., et al. Incorporation of the Beta3 Subunit has a Dominant-Negative Effect on the Function of Recombinant Central-Type Neuronal Nicotinic Receptors. *Molecular Pharmacology*, 20060705, Oct, 2006, vol. 70, no. 4, pp. 1350-1357. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

BROWN, K. L., et al. Trace Eyeblink Conditioning is Impaired in Alpha7 but Not in Beta2 Nicotinic Acetylcholine Receptor Knockout Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 20101008, Oct 8, 2010, vol. 4, pp. 166. ISSN 1662-5153; 1662-5153.

BUCKINGHAM, S. D., et al. Nicotinic Acetylcholine Receptor Signalling: Roles in Alzheimer's Disease and Amyloid Neuroprotection. *Pharmacological Reviews*, 20090316, Mar, 2009, vol. 61, no. 1, pp. 39-61. ISSN 1521-0081; 0031-6997.

BURCUSA, S. L.; and IACONO, W. G. Risk for Recurrence in Depression. *Clinical Psychology Review*, 20070303, Dec, 2007, vol. 27, no. 8, pp. 959-985. ISSN 0272-7358; 0272-7358.

CALAKOS, N.; and SCHELLER, R. H. Synaptic Vesicle Biogenesis, Docking, and Fusion: A Molecular Description. *Physiological Reviews*, Jan, 1996, vol. 76, no. 1, pp. 1-29. ISSN 0031-9333; 0031-9333.

CAMP, N. J., et al. Genome-Wide Linkage Analyses of Extended Utah Pedigrees Identifies Loci that Influence Recurrent, Early-Onset Major Depression and Anxiety Disorders. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics : The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, May 5, 2005, vol. 135B, no. 1, pp. 85-93. ISSN 1552-4841; 1552-4841.

CAMPBELL, N. R., et al. Endogenous Signaling through Alpha7-Containing Nicotinic Receptors Promotes Maturation and Integration of Adult-Born Neurons in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Jun 30, 2010, vol. 30, no. 26, pp. 8734-8744. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

CARBONETTO, S.; and FAMBROUGH, D. M. Synthesis, Insertion into the Plasma Membrane, and Turnover of Alpha-Bungarotoxin Receptors in Chick Sympathetic Neurons. *The Journal of Cell Biology*, Jun, 1979, vol. 81, no. 3, pp. 555-569. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

CARSON, R., et al. Genetic Variation in the Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor is Associated with Delusional Symptoms in Alzheimer's Disease. *Neuromolecular Medicine*, 20080812, 2008, vol. 10, no. 4, pp. 377-384. ISSN 1559-1174; 1535-1084.

CASPI, A., et al. Influence of Life Stress on Depression: Moderation by a Polymorphism in the 5-HTT Gene. *Science (New York, N.Y.)*, Jul 18, 2003, vol. 301, no. 5631, pp. 386-389. ISSN 1095-9203; 0036-8075.

CASTREN, E.; and RANTAMAKI, T. The Role of BDNF and its Receptors in Depression and Antidepressant Drug Action: Reactivation of Developmental Plasticity. *Developmental Neurobiology*, Apr, 2010, vol. 70, no. 5, pp. 289-297. ISSN 1932-846X; 1932-8451.

CASTREN, E.; VOIKAR, V. and RANTAMAKI, T. Role of Neurotrophic Factors in Depression. *Current Opinion in Pharmacology*, 20061017, Feb, 2007, vol. 7, no. 1, pp. 18-21. ISSN 1471-4892; 1471-4892.

CEDILLO, J. L., et al. Usefulness of Alpha7 Nicotinic Receptor Messenger RNA Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Marker for Cholinergic Antiinflammatory Pathway Activity in Septic Patients: Results of a Pilot Study. *The Journal of Infectious Diseases*, 20140804, Jan 1, 2015, vol. 211, no. 1, pp. 146-155. ISSN 1537-6613; 0022-1899.

CELIE, P. H., et al. Crystal Structure of Acetylcholine-Binding Protein from *Bulinus truncatus* Reveals the Conserved Structural Scaffold and Sites of Variation in Nicotinic Acetylcholine Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 20050516, Jul 15, 2005, vol. 280, no. 28, pp. 26457-26466. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

CHAMPTIAUX, N., et al. Subunit Composition of Functional Nicotinic Receptors in Dopaminergic Neurons Investigated with Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Aug 27, 2003, vol. 23, no. 21, pp. 7820-7829. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

CHANGEUX, J.; and EDELSTEIN, S. J. Allosteric Mechanisms in Normal and Pathological Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Current Opinion in Neurobiology*, Jun, 2001, vol. 11, no. 3, pp. 369-377. ISSN 0959-4388; 0959-4388.

CHANGEUX, J. P. Allosteric Receptors: From Electric Organ to Cognition. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2010, vol. 50, pp. 1-38. ISSN 1545-4304; 0362-1642.

CHARI, R., et al. A Sequence-Based Approach to Identify Reference Genes for Gene Expression Analysis. *BMC Medical Genomics*, 20100803, Aug 3, 2010, vol. 3, pp. 32-8794-3-32. ISSN 1755-8794; 1755-8794.

CHARLES, H. C., et al. Brain Choline in Depression: In Vivo Detection of Potential Pharmacodynamic Effects of Antidepressant Therapy using Hydrogen Localized Spectroscopy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, Nov, 1994, vol. 18, no. 7, pp. 1121-1127. ISSN 0278-5846; 0278-5846.

CHARPANTIER, E., et al. Alpha7 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors are Negatively Regulated by Tyrosine Phosphorylation and Src-Family Kinases. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Oct 26, 2005, vol. 25, no. 43, pp. 9836-9849. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

CHATTERJEE, S., et al. The Alpha5 Subunit Regulates the Expression and Function of Alpha4*-Containing Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Ventral-Tegmental Area. *PLoS One*, 20130715, Jul 15, 2013, vol. 8, no. 7, pp. e68300. ISSN 1932-6203; 1932-6203.

CHEN, D.; DANG, H. and PATRICK, J. W. Contributions of N-Linked Glycosylation to the Expression of a Functional Alpha7-Nicotinic Receptor in *Xenopus* Oocytes. *Journal of Neurochemistry*, Jan, 1998, vol. 70, no. 1, pp. 349-357. ISSN 0022-3042; 0022-3042.

CHENG, H.; and LEDERER, W. J. Calcium Sparks. *Physiological Reviews*, Oct, 2008, vol. 88, no. 4, pp. 1491-1545. ISSN 0031-9333; 0031-9333.

CHENG, Q.; and YAKEL, J. L. The Effect of Alpha7 Nicotinic Receptor Activation on Glutamatergic Transmission in the Hippocampus. *Biochemical Pharmacology*, 20150723, Oct 15, 2015, vol. 97, no. 4, pp. 439-444. ISSN 1873-2968; 0006-2952.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A. and O'BANION, M. K. Neuroinflammation and M2 Microglia: The Good, the Bad, and the Inflamed. *Journal of Neuroinflammation*, 20140603, Jun 3, 2014, vol. 11, pp. 98-2094-11-98. ISSN 1742-2094; 1742-2094.

CHIAO, H., et al. Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone Inhibits Renal Injury in the Absence of Neutrophils. *Kidney International*, Sep, 1998, vol. 54, no. 3, pp. 765-774. ISSN 0085-2538; 0085-2538.

CHILIAN, B., et al. Dysfunction of SHANK2 and CHRNA7 in a Patient with Intellectual Disability and Language Impairment Supports Genetic Epistasis of the Two Loci. *Clinical Genetics*, 20130221, Dec, 2013, vol. 84, no. 6, pp. 560-565. ISSN 1399-0004; 0009-9163.

CHRISTIANSON, J. C.; and GREEN, W. N. Regulation of Nicotinic Receptor Expression by the Ubiquitin-Proteasome System. *The EMBO Journal*, 20041014, Oct 27, 2004, vol. 23, no. 21, pp. 4156-4165. ISSN 0261-4189; 0261-4189.

CLODI, M., et al. Oxytocin Alleviates the Neuroendocrine and Cytokine Response to Bacterial Endotoxin in Healthy Men. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 20080701, Sep, 2008, vol. 295, no. 3, pp. E686-91. ISSN 0193-1849; 0193-1849.

COHEN, S. D., et al. Screening, Diagnosis, and Treatment of Depression in Patients with End-Stage Renal Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 20071017, Nov, 2007, vol. 2, no. 6, pp. 1332-1342. ISSN 1555-905X; 1555-9041.

COLOMBO, S. F., et al. Biogenesis, Trafficking and Up-Regulation of Nicotinic ACh Receptors. *Biochemical Pharmacology*, 20130703, Oct 15, 2013, vol. 86, no. 8, pp. 1063-1073. ISSN 1873-2968; 0006-2952.

COLOMER, C., et al. Functional Characterization of Alpha9-Containing Cholinergic Nicotinic Receptors in the Rat Adrenal Medulla: Implication in Stress-Induced Functional Plasticity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, May 12, 2010, vol. 30, no. 19, pp. 6732-6742. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

COOPER-KUHN, C. M.; WINKLER, J. and KUHN, H. G. Decreased Neurogenesis After Cholinergic Forebrain Lesion in the Adult Rat. *Journal of Neuroscience Research*, Jul 15, 2004, vol. 77, no. 2, pp. 155-165. ISSN 0360-4012; 0360-4012.

CORRADI, J.; and BOUZAT, C. Understanding the Bases of Function and Modulation of Alpha7 Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Molecular Pharmacology*, 20160509, Sep, 2016, vol. 90, no. 3, pp. 288-299. ISSN 1521-0111; 0026-895X.

CORRINGER, P. J.; LE NOVERE, N. and CHANGEUX, J. P. Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2000, vol. 40, pp. 431-458. ISSN 0362-1642; 0362-1642.

COSTANTINI, T. W., et al. CHRFA7A, a Human-Specific and Partially Duplicated Alpha7-Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene with the Potential to Specify a Human-Specific Inflammatory Response to Injury. *Journal of Leukocyte Biology*, 20141203, Feb, 2015, vol. 97, no. 2, pp. 247-257. ISSN 1938-3673; 0741-5400.

COURT, J. A., et al. Nicotinic Receptors in Human Brain: Topography and Pathology. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, Dec, 2000, vol. 20, no. 3-4, pp. 281-298. ISSN 0891-0618; 0891-0618.

COUSIN, M. A.; and EVANS, G. J. Activation of Silent and Weak Synapses by cAMP-Dependent Protein Kinase in Cultured Cerebellar Granule Neurons. *The Journal of Physiology*, 20110221, Apr 15, 2011, vol. 589, no. Pt 8, pp. 1943-1955. ISSN 1469-7793; 0022-3751.

DAGYTE, G.; DEN BOER, J. A. and TRENTANI, A. The Cholinergic System and Depression. *Behavioural Brain Research*, 20100216, Aug 10, 2011, vol. 221, no. 2, pp. 574-582. ISSN 1872-7549; 0166-4328.

DAJAS-BAILADOR, F.; and WONNACOTT, S. Nicotinic Acetylcholine Receptors and the Regulation of Neuronal Signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, Jun, 2004, vol. 25, no. 6, pp. 317-324. ISSN 0165-6147; 0165-6147.

DAJAS-BAILADOR, F. A.; LIMA, P. A. and WONNACOTT, S. The Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtype Mediates Nicotine Protection Against NMDA Excitotoxicity in Primary Hippocampal Cultures through a Ca(2+) Dependent Mechanism. *Neuropharmacology*, Oct, 2000, vol. 39, no. 13, pp. 2799-2807. ISSN 0028-3908; 0028-3908.

DANI, J. A. Overview of Nicotinic Receptors and their Roles in the Central Nervous System. *Biological Psychiatry*, Feb 1, 2001, vol. 49, no. 3, pp. 166-174. ISSN 0006-3223; 0006-3223.

DANI, J. A.; and BERTRAND, D. Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2007, vol. 47, pp. 699-729. ISSN 0362-1642; 0362-1642.

DANTZER, R., et al. From Inflammation to Sickness and Depression: When the Immune System Subjugates the Brain. *Nature Reviews.Neuroscience*, Jan, 2008, vol. 9, no. 1, pp. 46-56. ISSN 1471-0048; 1471-003X.

DAS, A., et al. Immobilization Stress-Induced Changes in Brain Acetylcholinesterase Activity and Cognitive Function in Mice. *Pharmacological Research*, Sep, 2000, vol. 42, no. 3, pp. 213-217. ISSN 1043-6618; 1043-6618.

DAU, A., et al. RIC-3 Differentially Modulates alpha4beta2 and Alpha7 Nicotinic Receptor Assembly, Expression, and Nicotine-Induced Receptor Upregulation. *BMC Neuroscience*, 20130415, Apr 15, 2013, vol. 14, pp. 47-2202-14-47. ISSN 1471-2202; 1471-2202.

DE BIASI, M. Nicotinic Receptor Mutant Mice in the Study of Autonomic Function. *Current Drug Targets.CNS and Neurological Disorders*, Aug, 2002, vol. 1, no. 4, pp. 331-336. ISSN 1568-007X; 1568-007X.

DE JONGE, W. J.; and ULLOA, L. The Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor as a Pharmacological Target for Inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 20070514, Aug, 2007, vol. 151, no. 7, pp. 915-929. ISSN 0007-1188; 0007-1188.

DE JONGE, W. J., et al. Stimulation of the Vagus Nerve Attenuates Macrophage Activation by Activating the Jak2-STAT3 Signaling Pathway. *Nature Immunology*, 20050717, Aug, 2005, vol. 6, no. 8, pp. 844-851. ISSN 1529-2908; 1529-2908.

DE LUCAS-CERRILLO, A. M., et al. Function of Partially Duplicated Human alpha77 Nicotinic Receptor Subunit CHRFA7A Gene: Potential Implications for the Cholinergic Anti-Inflammatory Response. *The Journal of Biological Chemistry*, 20101103, Jan 7, 2011, vol. 286, no. 1, pp. 594-606. ISSN 1083-351X; 0021-9258.

DE SIMONE, R., et al. Activation of Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor by Nicotine Selectively Up-Regulates Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 in Rat Microglial Cultures. *Journal of Neuroinflammation*, 20050125, Jan 25, 2005, vol. 2, no. 1, pp. 4. ISSN 1742-2094; 1742-2094.

DEDONI, S., et al. Type I Interferons Impair BDNF-Induced Cell Signaling and Neurotrophic Activity in Differentiated Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells and Mouse Primary Cortical Neurons. *Journal of Neurochemistry*, 20120521, Jul, 2012, vol. 122, no. 1, pp. 58-71. ISSN 1471-4159; 0022-3042.

DELGADO, P. L., et al. Tryptophan-Depletion Challenge in Depressed Patients Treated with Desipramine Or Fluoxetine: Implications for the Role of Serotonin in the Mechanism of Antidepressant Action. *Biological Psychiatry*, Jul 15, 1999, vol. 46, no. 2, pp. 212-220. ISSN 0006-3223; 0006-3223.

DEMIRCI, S., et al. Effects of Selenium and Topiramate on Cytosolic Ca(2+) Influx and Oxidative Stress in Neuronal PC12 Cells. *Neurochemical Research*, 20120926, Jan, 2013, vol. 38, no. 1, pp. 90-97. ISSN 1573-6903; 0364-3190.

DEUTSCH, J. A. The Cholinergic Synapse and the Site of Memory. *Science (New York, N.Y.)*, Nov 19, 1971, vol. 174, no. 4011, pp. 788-794. ISSN 0036-8075; 0036-8075.

DINELEY, K. T. Beta-Amyloid Peptide--Nicotinic Acetylcholine Receptor Interaction: The Two Faces of Health and Disease. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 20070901, Sep 1, 2007, vol. 12, pp. 5030-5038. ISSN 1093-9946; 1093-4715.

DINELEY, K. T.; PANDYA, A. A. and YAKEL, J. L. Nicotinic ACh Receptors as Therapeutic Targets in CNS Disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20150129, Feb, 2015, vol. 36, no. 2, pp. 96-108. ISSN 1873-3735; 0165-6147.

Donald rogers ronald pies. General Medical with Depression. *Psychiatry*, 2008, vol. 5, pp. 28-41.

DONNICI, L., et al. Time-Dependent Biphasic Modulation of Human BDNF by Antidepressants in Neuroblastoma Cells. *BMC Neuroscience*, 20080705, Jul 5, 2008, vol. 9, pp. 61-2202-9-61. ISSN 1471-2202; 1471-2202.

DOUGHERTY, D. A.; and LESTER, H. A. Neurobiology. Snails, Synapses and Smokers. *Nature*, May 17, 2001, vol. 411, no. 6835, pp. 252-3, 255. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

DOWLATI, Y., et al. A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biological Psychiatry*, 20091216, Mar 1, 2010, vol. 67, no. 5, pp. 446-457. ISSN 1873-2402; 0006-3223.

DRENAN, R. M., et al. Subcellular Trafficking, Pentameric Assembly, and Subunit Stoichiometry of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors Containing Fluorescently Labeled Alpha6 and Beta3 Subunits. *Molecular Pharmacology*, 20071011, Jan, 2008, vol. 73, no. 1, pp. 27-41. ISSN 1521-0111; 0026-895X.

DREVETS, W. C.; and FUREY, M. L. Replication of Scopolamine's Antidepressant Efficacy in Major Depressive Disorder: A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Biological Psychiatry*, 20100115, Mar 1, 2010, vol. 67, no. 5, pp. 432-438. ISSN 1873-2402; 0006-3223.

DUMAN, R. S.; and MONTEGGIA, L. M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. *Biological Psychiatry*, 20060421, Jun 15, 2006, vol. 59, no. 12, pp. 1116-1127. ISSN 0006-3223; 0006-3223.

DUTTA, R. K., et al. IL-6 Inhibits IFN-Gamma Induced Autophagy in Mycobacterium Tuberculosis H37Rv Infected Macrophages. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 20120307, Jun, 2012, vol. 44, no. 6, pp. 942-954. ISSN 1878-5875; 1357-2725.

DUVAL, F., et al. Cortisol Hypersecretion in Unipolar Major Depression with Melancholic and Psychotic Features: Dopaminergic, Noradrenergic and Thyroid Correlates. *Psychoneuroendocrinology*, 20060612, Aug, 2006, vol. 31, no. 7, pp. 876-888. ISSN 0306-4530; 0306-4530.

EGEA, J., et al. Anti-Inflammatory Role of Microglial Alpha7 nAChRs and its Role in Neuroprotection. *Biochemical Pharmacology*, 20150729, Oct 15, 2015, vol. 97, no. 4, pp. 463-472. ISSN 1873-2968; 0006-2952.

ELGOYHEN, A. B., et al. Alpha 9: An Acetylcholine Receptor with Novel Pharmacological Properties Expressed in Rat Cochlear Hair Cells. *Cell*, Nov 18, 1994, vol. 79, no. 4, pp. 705-715. ISSN 0092-8674; 0092-8674.

ELGOYHEN, A. B., et al. Alpha10: A Determinant of Nicotinic Cholinergic Receptor Function in Mammalian Vestibular and Cochlear Mechanosensory Hair Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20010306, Mar 13, 2001, vol. 98, no. 6, pp. 3501-3506. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

ELLIOTT, K. J., et al. Comparative Structure of Human Neuronal Alpha 2-Alpha 7 and Beta 2-Beta 4 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits and Functional Expression of the Alpha 2, Alpha 3, Alpha 4, Alpha 7, Beta 2, and Beta 4 Subunits. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, Fall, 1996, vol. 7, no. 3, pp. 217-228. ISSN 0895-8696; 0895-8696.

EYRE, H. A.; STUART, M. J. and BAUNE, B. T. A Phase-Specific Neuroimmune Model of Clinical Depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 20140703, Oct 3, 2014, vol. 54, pp. 265-274. ISSN 1878-4216; 0278-5846.

FENSTER, C. P., et al. Influence of Subunit Composition on Desensitization of Neuronal Acetylcholine Receptors at Low Concentrations of Nicotine. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Aug 1, 1997, vol. 17, no. 15, pp. 5747-5759. ISSN 0270-6474; 0270-6474.

FERTUCK, H. C.; and SALPETER, M. M. Localization of Acetylcholine Receptor by 125I-Labeled Alpha-Bungarotoxin Binding at Mouse Motor Endplates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Apr, 1974, vol. 71, no. 4, pp. 1376-1378. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

FLOMEN, R. H., et al. Association Study of CHRFAM7A Copy Number and 2 Bp Deletion Polymorphisms with Schizophrenia and Bipolar Affective Disorder. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics : The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, Sep 5, 2006, vol. 141B, no. 6, pp. 571-575. ISSN 1552-4841; 1552-4841.

Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz. *J Microsc.*, 2006, vol. 437, no. Dec, 224, pp. 213-232.

FOWLER, C. D., et al. Habenular Alpha5 Nicotinic Receptor Subunit Signalling Controls Nicotine Intake. *Nature*, 20110130, Mar 31, 2011, vol. 471, no. 7340, pp. 597-601. ISSN 1476-4687; 0028-0836.

FRAZER, A. Pharmacology of Antidepressants. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, Apr, 1997, vol. 17 Suppl 1, pp. 2S-18S. ISSN 0271-0749; 0271-0749.

FRAZIER, C. J., et al. Synaptic Potentials Mediated Via Alpha-Bungarotoxin-Sensitive Nicotinic Acetylcholine Receptors in Rat Hippocampal Interneurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Oct 15, 1998, vol. 18, no. 20, pp. 8228-8235. ISSN 0270-6474; 0270-6474.

FREEDMAN, R. Alpha7-Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists for Cognitive Enhancement in Schizophrenia. *Annual Review of Medicine*, 20131009, 2014, vol. 65, pp. 245-261. ISSN 1545-326X; 0066-4219.

FREEDMAN, R., et al. Linkage of a Neurophysiological Deficit in Schizophrenia to a Chromosome 15 Locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jan 21, 1997, vol. 94, no. 2, pp. 587-592. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

- FREEDMAN, R., et al. Evidence in Postmortem Brain Tissue for Decreased Numbers of Hippocampal Nicotinic Receptors in Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, Jul 1, 1995, vol. 38, no. 1, pp. 22-33. ISSN 0006-3223; 0006-3223.
- FREITAS, A. E., et al. Agmatine Induces Nrf2 and Protects Against Corticosterone Effects in Hippocampal Neuronal Cell Line. *Molecular Neurobiology*, 20140802, 2015, vol. 51, no. 3, pp. 1504-1519. ISSN 1559-1182; 0893-7648.
- FUCILE, S. Ca²⁺ Permeability of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Cell Calcium*, Jan, 2004, vol. 35, no. 1, pp. 1-8. ISSN 0143-4160; 0143-4160.
- FUCILE, S., et al. Fractional Ca(2+) Current through Human Neuronal Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Cell Calcium*, Aug, 2003, vol. 34, no. 2, pp. 205-209. ISSN 0143-4160; 0143-4160.
- FUREY, M. L., et al. Scopolamine Produces Larger Antidepressant and Antianxiety Effects in Women than in Men. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 20100825, Nov, 2010, vol. 35, no. 12, pp. 2479-2488. ISSN 1740-634X; 0893-133X.
- GAIMARRI, A., et al. Regulation of Neuronal Nicotinic Receptor Traffic and Expression. *Brain Research Reviews*, 20070224, Aug, 2007, vol. 55, no. 1, pp. 134-143. ISSN 0165-0173; 0165-0173.
- GALZI, J. L., et al. Functional Architecture of the Nicotinic Acetylcholine Receptor: From Electric Organ to Brain. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1991, vol. 31, pp. 37-72. ISSN 0362-1642; 0362-1642.
- GAULT, J., et al. Comparison of Polymorphisms in the Alpha7 Nicotinic Receptor Gene and its Partial Duplication in Schizophrenic and Control Subjects. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics : The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, Nov 15, 2003, vol. 123B, no. 1, pp. 39-49. ISSN 1552-4841; 1552-4841.
- GAULT, J., et al. Genomic Organization and Partial Duplication of the Human Alpha7 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene (CHRNA7). *Genomics*, Sep 1, 1998, vol. 52, no. 2, pp. 173-185. ISSN 0888-7543; 0888-7543.
- GERSHON, S.; and SHAW, F. H. Psychiatric Sequelae of Chronic Exposure to Organophosphorus Insecticides. *Lancet (London, England)*, Jun 24, 1961, vol. 1, no. 7191, pp. 1371-1374. ISSN 0140-6736; 0140-6736.
- GERZANICH, V.; ANAND, R. and LINDSTROM, J. Homomers of Alpha 8 and Alpha 7 Subunits of Nicotinic Receptors Exhibit Similar Channel but Contrasting Binding Site Properties. *Molecular Pharmacology*, Feb, 1994, vol. 45, no. 2, pp. 212-220. ISSN 0026-895X; 0026-895X.
- GERZANICH, V., et al. Alpha 5 Subunit Alters Desensitization, Pharmacology, Ca⁺⁺ Permeability and Ca⁺⁺ Modulation of Human Neuronal Alpha 3 Nicotinic Receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Jul, 1998, vol. 286, no. 1, pp. 311-320. ISSN 0022-3565; 0022-3565.
- GHIA, J. E., et al. The Vagus Nerve: A Tonic Inhibitory Influence Associated with Inflammatory Bowel Disease in a Murine Model. *Gastroenterology*, 20060815, Oct, 2006, vol. 131, no. 4, pp. 1122-1130. ISSN 0016-5085; 0016-5085.
- GILAD, G. M. The Stress-Induced Response of the Septo-Hippocampal Cholinergic System. A Vectorial Outcome of Psychoneuroendocrinological Interactions. *Psychoneuroendocrinology*, 1987, vol. 12, no. 3, pp. 167-184. ISSN 0306-4530; 0306-4530.
- GIL-AD, I., et al. Evaluation of the Potential Anti-Cancer Activity of the Antidepressant Sertraline in Human Colon Cancer Cell Lines and in Colorectal Cancer-Xenografted Mice. *International Journal of Oncology*, Aug, 2008, vol. 33, no. 2, pp. 277-286. ISSN 1019-6439; 1019-6439.
- GOODWIN, F. K.; and BUNNEY, W. E., Jr. Depressions Following Reserpine: A Reevaluation. *Seminars in Psychiatry*, Nov, 1971, vol. 3, no. 4, pp. 435-448. ISSN 0037-1971; 0037-1971.
- GOTTI, C.; and CLEMENTI, F. Neuronal Nicotinic Receptors: From Structure to Pathology. *Progress in Neurobiology*, Dec, 2004, vol. 74, no. 6, pp. 363-396. ISSN 0301-0082; 0301-0082.
- GOTTI, C., et al. Structural and Functional Diversity of Native Brain Neuronal Nicotinic Receptors. *Biochemical Pharmacology*, 20090527, Oct 1, 2009, vol. 78, no. 7, pp. 703-711. ISSN 1873-2968; 0006-2952.
- GOTTI, C., et al. Expression of Nigrostriatal Alpha 6-Containing Nicotinic Acetylcholine Receptors is Selectively Reduced, but Not Eliminated, by Beta 3 Subunit Gene Deletion. *Molecular Pharmacology*, 20050304, Jun, 2005, vol. 67, no. 6, pp. 2007-2015. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

GOTTI, C.; ZOLI, M. and CLEMENTI, F. Brain Nicotinic Acetylcholine Receptors: Native Subtypes and their Relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20060731, Sep, 2006, vol. 27, no. 9, pp. 482-491. ISSN 0165-6147; 0165-6147.

GOULD, J., et al. Nicotinic Acetylcholine Receptors in Human Neuroblastoma (SH-SY5Y) Cells. *Neuroscience Letters*, Oct 12, 1992, vol. 145, no. 2, pp. 201-204. ISSN 0304-3940; 0304-3940.

GRAY, R., et al. Hippocampal Synaptic Transmission Enhanced by Low Concentrations of Nicotine. *Nature*, Oct 24, 1996, vol. 383, no. 6602, pp. 713-716. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

GRINEVICH, V. P., et al. Heterologous Expression of Human $\alpha 6\beta 4\beta 3\alpha 5$ Nicotinic Acetylcholine Receptors: Binding Properties Consistent with their Natural Expression Require Quaternary Subunit Assembly Including the $\alpha 5$ Subunit. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 20040908, Feb, 2005, vol. 312, no. 2, pp. 619-626. ISSN 0022-3565; 0022-3565.

GRISANTI, L. A., et al. $\alpha 1$ -Adrenergic Receptors Positively Regulate Toll-Like Receptor Cytokine Production from Human Monocytes and Macrophages. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 20110513, Aug, 2011, vol. 338, no. 2, pp. 648-657. ISSN 1521-0103; 0022-3565.

GRONLIEN, J. H., et al. Distinct Profiles of $\alpha 7$ nAChR Positive Allosteric Modulation Revealed by Structurally Diverse Chemotypes. *Molecular Pharmacology*, 20070612, Sep, 2007, vol. 72, no. 3, pp. 715-724. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

GU, S., et al. Brain $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly Requires NACHO. *Neuron*, 20160211, Mar 2, 2016, vol. 89, no. 5, pp. 948-955. ISSN 1097-4199; 0896-6273.

GUAN, Z. Z., et al. Decreased Protein Level of Nicotinic Receptor $\alpha 7$ Subunit in the Frontal Cortex from Schizophrenic Brain. *Neuroreport*, Jun 3, 1999, vol. 10, no. 8, pp. 1779-1782. ISSN 0959-4965; 0959-4965.

GUARINI, S., et al. Efferent Vagal Fibre Stimulation Blunts Nuclear Factor- κ B Activation and Protects Against Hypovolemic Hemorrhagic Shock. *Circulation*, Mar 4, 2003, vol. 107, no. 8, pp. 1189-1194. ISSN 1524-4539; 0009-7322.

GUEORGUIEV, V. D., et al. Differing Temporal Roles of Ca^{2+} and cAMP in Nicotine-Elicited Elevation of Tyrosine Hydroxylase mRNA. *The American Journal of Physiology*, Jan, 1999, vol. 276, no. 1 Pt 1, pp. C54-65. ISSN 0002-9513; 0002-9513.

HAJOS, M., et al. The Selective $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist PNU-282987 [N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]Oct-3-Yl]-4-Chlorobenzamide Hydrochloride] Enhances GABAergic Synaptic Activity in Brain Slices and Restores Auditory Gating Deficits in Anesthetized Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 20041102, Mar, 2005, vol. 312, no. 3, pp. 1213-1222. ISSN 0022-3565; 0022-3565.

HAMILTON, A. J.; and BAULCOMBE, D. C. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science (New York, N.Y.)*, Oct 29, 1999, vol. 286, no. 5441, pp. 950-952. ISSN 0036-8075; 0036-8075.

HANSEN, S. B., et al. Structures of Aplysia AChBP Complexes with Nicotinic Agonists and Antagonists Reveal Distinctive Binding Interfaces and Conformations. *The EMBO Journal*, 20050929, Oct 19, 2005, vol. 24, no. 20, pp. 3635-3646. ISSN 0261-4189; 0261-4189.

HANSEN-GRANT, S. M. y. col. Neuroendocrine and Immune System Pathology in Psychiatric Disease. *Textbook of Psychopharmacology*, 1998, pp. 171-187.

HEFFT, S., et al. Synaptic Transmission at Nicotinic Acetylcholine Receptors in Rat Hippocampal Organotypic Cultures and Slices. *The Journal of Physiology*, Mar 15, 1999, vol. 515 (Pt 3), no. Pt 3, pp. 769-776. ISSN 0022-3751; 0022-3751.

HEINEMANN, S., et al. The Brain Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Family. *Progress in Brain Research*, 1990, vol. 86, pp. 195-203. ISSN 0079-6123; 0079-6123.

HELBIG, I., et al. 15q13.3 Microdeletions Increase Risk of Idiopathic Generalized Epilepsy. *Nature Genetics*, 20090111, Feb, 2009, vol. 41, no. 2, pp. 160-162. ISSN 1546-1718; 1061-4036.

HERNANDEZ, S. C., et al. The Nicotinic Receptor in the Rat Pineal Gland is an $\alpha 3\beta 4$ Subtype. *Molecular Pharmacology*, 20040709, Oct, 2004, vol. 66, no. 4, pp. 978-987. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

HEVEKERL, H., et al. Forster Resonance Energy Transfer Beyond 10 Nm: Exploiting the Triplet State Kinetics of Organic Fluorophores. *The Journal of Physical Chemistry.B*, 20111019, Nov 17, 2011, vol. 115, no. 45, pp. 13360-13370. ISSN 1520-5207; 1520-5207.

HEYDUK, T. Measuring Protein Conformational Changes by FRET/LRET. *Current Opinion in Biotechnology*, Aug, 2002, vol. 13, no. 4, pp. 292-296. ISSN 0958-1669; 0958-1669.

HILFIKER, S.; GREENGARD, P. and AUGUSTINE, G. J. Coupling Calcium to SNARE-Mediated Synaptic Vesicle Fusion. *Nature Neuroscience*, Feb, 1999, vol. 2, no. 2, pp. 104-106. ISSN 1097-6256; 1097-6256.

HINWOOD, M., et al. Evidence that Microglia Mediate the Neurobiological Effects of Chronic Psychological Stress on the Medial Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 20110830, Jun, 2012, vol. 22, no. 6, pp. 1442-1454. ISSN 1460-2199; 1047-3211.

HOANG, H., et al. Psychiatric Co-Morbidity in Multiple Sclerosis: The Risk of Depression and Anxiety before and After MS Diagnosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 20150603, Mar, 2016, vol. 22, no. 3, pp. 347-353. ISSN 1477-0970; 1352-4585.

HODA, J. C., et al. Pleiotropic Functional Effects of the First Epilepsy-Associated Mutation in the Human CHRNA2 Gene. *FEBS Letters*, 20090419, May 19, 2009, vol. 583, no. 10, pp. 1599-1604. ISSN 1873-3468; 0014-5793.

HONG, C. J., et al. Association Study of the Human Partially Duplicated Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Genetic Variant with Bipolar Disorder. *Neuroscience Letters*, Jan 23, 2004, vol. 355, no. 1-2, pp. 69-72. ISSN 0304-3940; 0304-3940.

HOPPMAN-CHANEY, N., et al. Identification of Single Gene Deletions at 15q13.3: Further Evidence that CHRNA7 Causes the 15q13.3 Microdeletion Syndrome Phenotype. *Clinical Genetics*, 20120807, Apr, 2013, vol. 83, no. 4, pp. 345-351. ISSN 1399-0004; 0009-9163.

HOWLAND, R. H. Vagus Nerve Stimulation. *Current Behavioral Neuroscience Reports*, Jun, 2014, vol. 1, no. 2, pp. 64-73.

HOYLE, E., et al. Impaired Performance of Alpha7 Nicotinic Receptor Knockout Mice in the Five-Choice Serial Reaction Time Task. *Psychopharmacology*, 20060920, Dec, 2006, vol. 189, no. 2, pp. 211-223. ISSN 0033-3158; 0033-3158.

HSU, M. P., et al. Analysis of IL-6/gp130 Family Receptor Expression Reveals that in Contrast to Astroglia, Microglia Lack the Oncostatin M Receptor and Functional Responses to Oncostatin M. *Glia*, 20140807, Jan, 2015, vol. 63, no. 1, pp. 132-141. ISSN 1098-1136; 0894-1491.

HU, M., et al. Nicotinic Regulation of CREB Activation in Hippocampal Neurons by Glutamatergic and Nonglutamatergic Pathways. *Molecular and Cellular Neurosciences*, Dec, 2002, vol. 21, no. 4, pp. 616-625. ISSN 1044-7431; 1044-7431.

HURST, R.; ROLLEMA, H. and BERTRAND, D. Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Basic Science to Therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 20120825, Jan, 2013, vol. 137, no. 1, pp. 22-54. ISSN 1879-016X; 0163-7258.

HURST, R. S., et al. A Novel Positive Allosteric Modulator of the Alpha7 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor: In Vitro and in Vivo Characterization. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Apr 27, 2005, vol. 25, no. 17, pp. 4396-4405. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

HYMAN, S. E. A Glimmer of Light for Neuropsychiatric Disorders. *Nature*, Oct 16, 2008, vol. 455, no. 7215, pp. 890-893. ISSN 1476-4687; 0028-0836.

IRWIN, M.; and GILLIN, J. C. Impaired Natural Killer Cell Activity among Depressed Patients. *Psychiatry Research*, Feb, 1987, vol. 20, no. 2, pp. 181-182. ISSN 0165-1781; 0165-1781.

JACK, C. S., et al. TLR Signaling Tailors Innate Immune Responses in Human Microglia and Astrocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, Oct 1, 2005, vol. 175, no. 7, pp. 4320-4330. ISSN 0022-1767; 0022-1767.

JANABI, N., et al. Establishment of Human Microglial Cell Lines After Transfection of Primary Cultures of Embryonic Microglial Cells with the SV40 Large T Antigen. *Neuroscience Letters*, Aug 4, 1995, vol. 195, no. 2, pp. 105-108. ISSN 0304-3940; 0304-3940.

JANOWSKY, D. S.; EL-YOUSEF, M. K. and DAVIS, J. M. Acetylcholine and Depression. *Psychosomatic Medicine*, May-Jun, 1974, vol. 36, no. 3, pp. 248-257. ISSN 0033-3174; 0033-3174.

JANOWSKY, D. S., et al. A Cholinergic-Adrenergic Hypothesis of Mania and Depression. *Lancet (London, England)*, Sep 23, 1972, vol. 2, no. 7778, pp. 632-635. ISSN 0140-6736; 0140-6736.

JANOWSKY, D. S., et al. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Regulation, Neurotransmitters and Affective Disorders. *Peptides*, Sep-Oct, 1983, vol. 4, no. 5, pp. 775-784. ISSN 0196-9781; 0196-9781.

JANTAS, D.; KRAWCZYK, S. and LASON, W. The Predominant Protective Effect of Tianeptine Over Other Antidepressants in Models of Neuronal Apoptosis: The Effect Blocked by Inhibitors of MAPK/ERK1/2 and PI3-K/Akt Pathways. *Neurotoxicity Research*, 20131009, Feb, 2014, vol. 25, no. 2, pp. 208-225. ISSN 1476-3524; 1029-8428.

JEANCLOS, E. M., et al. The Chaperone Protein 14-3-3 β Interacts with the Nicotinic Acetylcholine Receptor α 4 Subunit. Evidence for a Dynamic Role in Subunit Stabilization. *The Journal of Biological Chemistry*, 20010514, Jul 27, 2001, vol. 276, no. 30, pp. 28281-28290. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

Jl, D.; and DANI, J. A. Inhibition and Disinhibition of Pyramidal Neurons by Activation of Nicotinic Receptors on Hippocampal Interneurons. *Journal of Neurophysiology*, May, 2000, vol. 83, no. 5, pp. 2682-2690. ISSN 0022-3077; 0022-3077.

JOHNSTON, G. R.; and WEBSTER, N. R. Cytokines and the Immunomodulatory Function of the Vagus Nerve. *British Journal of Anaesthesia*, 20090303, Apr, 2009, vol. 102, no. 4, pp. 453-462. ISSN 1471-6771; 0007-0912.

JONES, A. K.; BUCKINGHAM, S. D. and SATTELLE, D. B. Proteins Interacting with Nicotinic Acetylcholine Receptors: Expanding Functional and Therapeutic Horizons. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20100730, Oct, 2010, vol. 31, no. 10, pp. 455-462. ISSN 1873-3735; 0165-6147.

JUN, T. Y., et al. Tumor Necrosis Factor- β Gene Polymorphism may Not be Associated with Major Depressive Disorder in the Korean Population. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, Feb, 2003a, vol. 57, no. 1, pp. 31-35. ISSN 1323-1316; 1323-1316.

JUN, T. Y., et al. Possible Association between -G308A Tumor Necrosis Factor- α Gene Polymorphism and Major Depressive Disorder in the Korean Population. *Psychiatric Genetics*, Sep, 2003b, vol. 13, no. 3, pp. 179-181. ISSN 0955-8829; 0955-8829.

KABBANI, N., et al. Are Nicotinic Acetylcholine Receptors Coupled to G Proteins?. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, Dec, 2013, vol. 35, no. 12, pp. 1025-1034. ISSN 1521-1878; 0265-9247.

KADIR, A., et al. PET Imaging of Cortical 11C-Nicotine Binding Correlates with the Cognitive Function of Attention in Alzheimer's Disease. *Psychopharmacology*, 20060711, Nov, 2006, vol. 188, no. 4, pp. 509-520. ISSN 0033-3158; 0033-3158.

KALAPPA, B. I., et al. A Positive Allosteric Modulator of α 7 nAChRs Augments Neuroprotective Effects of Endogenous Nicotinic Agonists in Cerebral Ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, Aug, 2013, vol. 169, no. 8, pp. 1862-1878. ISSN 1476-5381; 0007-1188.

KALKMAN, H. O.; and FEUERBACH, D. Modulatory Effects of α 7 nAChRs on the Immune System and its Relevance for CNS Disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 20160315, Jul, 2016, vol. 73, no. 13, pp. 2511-2530. ISSN 1420-9071; 1420-682X.

KARLIN, A.; and AKABAS, M. H. Toward a Structural Basis for the Function of Nicotinic Acetylcholine Receptors and their Cousins. *Neuron*, Dec, 1995, vol. 15, no. 6, pp. 1231-1244. ISSN 0896-6273; 0896-6273.

KAUR, T., et al. Efficacy of Anti-Epileptic Drugs in the Treatment of Tumor and its Associated Epilepsy: An in Vitro Perspective. *Annals of Neurosciences*, 20160311, Mar, 2016, vol. 23, no. 1, pp. 33-43. ISSN 0972-7531; 0972-7531.

KHIROUG, L., et al. Functional Mapping and Ca^{2+} Regulation of Nicotinic Acetylcholine Receptor Channels in Rat Hippocampal CA1 Neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Oct 8, 2003, vol. 23, no. 27, pp. 9024-9031. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

KIM, Y. K.; and WON, E. The Influence of Stress on Neuroinflammation and Alterations in Brain Structure and Function in Major Depressive Disorder. *Behavioural Brain Research*, 20170422, Apr 22, 2017, vol. 329, pp. 6-11. ISSN 1872-7549; 0166-4328.

KING, J. R., et al. Identification and Characterization of a G Protein-Binding Cluster in α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 20150618, Aug 14, 2015, vol. 290, no. 33, pp. 20060-20070. ISSN 1083-351X; 0021-9258.

KITAGAMI, T., et al. Mechanism of Systemically Injected Interferon- α Impeding Monoamine Biosynthesis in Rats: Role of Nitric Oxide as a Signal Crossing the Blood-Brain Barrier. *Brain Research*, Jul 18, 2003, vol. 978, no. 1-2, pp. 104-114. ISSN 0006-8993; 0006-8993.

KLAPPROTH, H., et al. Non-Neuronal Acetylcholine, a Signalling Molecule Synthesized by Surface Cells of Rat and Man. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Apr, 1997, vol. 355, no. 4, pp. 515-523. ISSN 0028-1298; 0028-1298.

KOBAYASHI, K., et al. IRAK-M is a Negative Regulator of Toll-Like Receptor Signaling. *Cell*, Jul 26, 2002, vol. 110, no. 2, pp. 191-202. ISSN 0092-8674; 0092-8674.

KOHLER, O., et al. Effect of Anti-Inflammatory Treatment on Depression, Depressive Symptoms, and Adverse Effects: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *JAMA Psychiatry*, Dec 1, 2014, vol. 71, no. 12, pp. 1381-1391. ISSN 2168-6238; 2168-622X.

KONDO, Y., et al. Inflammatory Cytokines Decrease the Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor during the Cell Maturation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 20090722, Jan, 2010, vol. 333, no. 1-2, pp. 57-64. ISSN 1573-4919; 0300-8177.

KONG, W. J.; CHENG, H. M. and VAN CAUWENBERGE, P. Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Alpha9 in Type II Vestibular Hair Cells of Rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, Nov, 2006, vol. 27, no. 11, pp. 1509-1514. ISSN 1671-4083; 1671-4083.

KONSMAN, J. P., et al. Central Nervous Action of Interleukin-1 Mediates Activation of Limbic Structures and Behavioural Depression in Response to Peripheral Administration of Bacterial Lipopolysaccharide. *The European Journal of Neuroscience*, Dec, 2008, vol. 28, no. 12, pp. 2499-2510. ISSN 1460-9568; 0953-816X.

KORNFELD, R.; and KORNFELD, S. Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*, 1985, vol. 54, pp. 631-664. ISSN 0066-4154; 0066-4154.

KOVALEVICH, J.; and LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2013, vol. 1078, pp. 9-21. ISSN 1940-6029; 1064-3745.

KRAUSGRUBER, T., et al. IRF5 Promotes Inflammatory Macrophage Polarization and TH1-TH17 Responses. *Nature Immunology*, 20110116, Mar, 2011, vol. 12, no. 3, pp. 231-238. ISSN 1529-2916; 1529-2908.

KRISHNAN, V.; and NESTLER, E. J. The Molecular Neurobiology of Depression. *Nature*, Oct 16, 2008, vol. 455, no. 7215, pp. 894-902. ISSN 1476-4687; 0028-0836.

KUDIELKA, B. M.; HELHAMMER, D. H. and WUST, S. Why do we Respond so Differently? Reviewing Determinants of Human Salivary Cortisol Responses to Challenge. *Psychoneuroendocrinology*, 20081128, Jan, 2009, vol. 34, no. 1, pp. 2-18. ISSN 0306-4530; 0306-4530.

KUEHNER, C. Gender Differences in Unipolar Depression: An Update of Epidemiological Findings and Possible Explanations. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, Sep, 2003, vol. 108, no. 3, pp. 163-174. ISSN 0001-690X; 0001-690X.

KUMMER, W.; LIPS, K. S. and PFEIL, U. The Epithelial Cholinergic System of the Airways. *Histochemistry and Cell Biology*, 20080620, Aug, 2008, vol. 130, no. 2, pp. 219-234. ISSN 0948-6143; 0948-6143.

KUNCL, R. W., et al. A Novel Therapy for Myasthenia Gravis by Reducing the Endocytosis of Acetylcholine Receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Jun 21, 1993, vol. 681, pp. 298-302. ISSN 0077-8923; 0077-8923.

KUNG, M., et al. Addition of G418 and Other Aminoglycoside Antibiotics to Mammalian Cells Results in the Release of GPI-Anchored Proteins. *FEBS Letters*, Jun 16, 1997, vol. 409, no. 3, pp. 333-338. ISSN 0014-5793; 0014-5793.

KURYATOV, A.; ONKSEN, J. and LINDSTROM, J. Roles of Accessory Subunits in alpha4beta2(*) Nicotinic Receptors. *Molecular Pharmacology*, 20080401, Jul, 2008, vol. 74, no. 1, pp. 132-143. ISSN 1521-0111; 0026-895X.

LAM, D. C., et al. Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Genes in Non-Small-Cell Lung Cancer Reveals Differences between Smokers and Nonsmokers. *Cancer Research*, May 15, 2007, vol. 67, no. 10, pp. 4638-4647. ISSN 0008-5472; 0008-5472.

LAM, R. W. Addressing Circadian Rhythm Disturbances in Depressed Patients. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, Sep, 2008, vol. 22, no. 7 Suppl, pp. 13-18. ISSN 1461-7285; 0269-8811.

LANSDALL, S. J., et al. RIC-3 Enhances Functional Expression of Multiple Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes in Mammalian Cells. *Molecular Pharmacology*, 20050824, Nov, 2005, vol. 68, no. 5, pp. 1431-1438. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

LAVIOLETTE, S. R.; and VAN DER KOOY, D. The Neurobiology of Nicotine Addiction: Bridging the Gap from Molecules to Behaviour. *Nature Reviews. Neuroscience*, Jan, 2004, vol. 5, no. 1, pp. 55-65. ISSN 1471-003X; 1471-003X.

LE NOVERE, N.; CORRINGER, P. J. and CHANGEUX, J. P. The Diversity of Subunit Composition in nAChRs: Evolutionary Origins, Physiologic and Pharmacologic Consequences. *Journal of Neurobiology*, Dec, 2002, vol. 53, no. 4, pp. 447-456. ISSN 0022-3034; 0022-3034.

LEE, C. Y., et al. The Effects of Antiepileptic Drugs on the Growth of Glioblastoma Cell Lines. *Journal of Neuro-Oncology*, 20160113, May, 2016, vol. 127, no. 3, pp. 445-453. ISSN 1573-7373; 0167-594X.

LEE, Y. B.; NAGAI, A. and KIM, S. U. Cytokines, Chemokines, and Cytokine Receptors in Human Microglia. *Journal of Neuroscience Research*, Jul 1, 2002, vol. 69, no. 1, pp. 94-103. ISSN 0360-4012; 0360-4012.

LENA, C.; CHANGEUX, J. P. and MULLE, C. Evidence for "Preterminal" Nicotinic Receptors on GABAergic Axons in the Rat Interpeduncular Nucleus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Jun, 1993, vol. 13, no. 6, pp. 2680-2688. ISSN 0270-6474; 0270-6474.

LENDVAI, B., et al. Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors and their Role in Cognition. *Brain Research Bulletin*, 20121120, Apr, 2013, vol. 93, pp. 86-96. ISSN 1873-2747; 0361-9230.

LEONARD, S., et al. Association of Promoter Variants in the Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Gene with an Inhibitory Deficit found in Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, Dec, 2002, vol. 59, no. 12, pp. 1085-1096. ISSN 0003-990X; 0003-990X.

LETCHWORTH, S. R.; and WHITEAKER, P. Progress and Challenges in the Study of Alpha6-Containing Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Biochemical Pharmacology*, 20110628, Oct 15, 2011, vol. 82, no. 8, pp. 862-872. ISSN 1873-2968; 0006-2952.

LI, P.; and STEINBACH, J. H. The Neuronal Nicotinic alpha4beta2 Receptor has a High Maximal Probability of being Open. *British Journal of Pharmacology*, Aug, 2010, vol. 160, no. 8, pp. 1906-1915. ISSN 1476-5381; 0007-1188.

LIAO, Y., et al. Elevations in the Levels of NF-kappaB and Inflammatory Chemotactic Factors in the Brains with Alzheimer's Disease - One Mechanism may Involve Alpha3 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Current Alzheimer Research*, 2016, vol. 13, no. 11, pp. 1290-1301. ISSN 1875-5828; 1567-2050.

LIPS, K. S., et al. Nicotinic Acetylcholine Receptors in Rat and Human Placenta. *Placenta*, 20041215, Nov, 2005, vol. 26, no. 10, pp. 735-746. ISSN 0143-4004; 0143-4004.

LIPS, K. S.; PFEIL, U. and KUMMER, W. Coexpression of Alpha 9 and Alpha 10 Nicotinic Acetylcholine Receptors in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *Neuroscience*, 2002, vol. 115, no. 1, pp. 1-5. ISSN 0306-4522; 0306-4522.

LOCKE, D. P., et al. Refinement of a Chimpanzee Pericentric Inversion Breakpoint to a Segmental Duplication Cluster. *Genome Biology*, 20030715, 2003, vol. 4, no. 8, pp. R50. ISSN 1474-760X; 1474-7596.

LUCASSEN, P. J., et al. Hippocampal Apoptosis in Major Depression is a Minor Event and Absent from Subareas at Risk for Glucocorticoid Overexposure. *The American Journal of Pathology*, Feb, 2001, vol. 158, no. 2, pp. 453-468. ISSN 0002-9440; 0002-9440.

Lukas RJ Bencherif M. Recent Developments in Nicotinic Acetylcholine Receptor Biology., 2006, pp. pp 27-59.

LUKAS, R. J.; NORMAN, S. A. and LUCERO, L. Characterization of Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed by Cells of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Clonal Line. *Molecular and Cellular Neurosciences*, Feb, 1993, vol. 4, no. 1, pp. 1-12. ISSN 1044-7431; 1044-7431.

LUPINO, E., et al. Exposure of Neuroblastoma Cell Lines to Imatinib Results in the Upregulation of the CDK Inhibitor p27(KIP1) as a Consequence of C-Abl Inhibition. *Biochemical Pharmacology*, 20140926, Nov 15, 2014, vol. 92, no. 2, pp. 235-250. ISSN 1873-2968; 0006-2952.

MAASHO, K., et al. Efficient Gene Transfer into the Human Natural Killer Cell Line, NKL, using the Amaxa Nucleofection System. *Journal of Immunological Methods*, Jan, 2004, vol. 284, no. 1-2, pp. 133-140. ISSN 0022-1759; 0022-1759.

MAES, M. Major Depression and Activation of the Inflammatory Response System. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1999, vol. 461, pp. 25-46. ISSN 0065-2598; 0065-2598.

MAES, M. Evidence for an Immune Response in Major Depression: A Review and Hypothesis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, Jan, 1995, vol. 19, no. 1, pp. 11-38. ISSN 0278-5846; 0278-5846.

MAGGI, L., et al. Nicotine Activates Immature "Silent" Connections in the Developing Hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20030211, Feb 18, 2003, vol. 100, no. 4, pp. 2059-2064. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

MALBERG, J. E., et al. Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Dec 15, 2000, vol. 20, no. 24, pp. 9104-9110. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

MALDIFASSI, M. C., et al. A New IRAK-M-Mediated Mechanism Implicated in the Anti-Inflammatory Effect of Nicotine Via Alpha7 Nicotinic Receptors in Human Macrophages. *PLoS One*, 20140926, Sep 26, 2014, vol. 9, no. 9, pp. e108397. ISSN 1932-6203; 1932-6203.

MANDAIRON, N., et al. Cholinergic Modulation in the Olfactory Bulb Influences Spontaneous Olfactory Discrimination in Adult Rats. *The European Journal of Neuroscience*, Dec, 2006, vol. 24, no. 11, pp. 3234-3244. ISSN 0953-816X; 0953-816X.

MAO, X. Y., et al. Topiramate Protects Against Glutamate Excitotoxicity Via Activating BDNF/TrkB-Dependent ERK Pathway in Rodent Hippocampal Neurons. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 20150207, Jul 3, 2015, vol. 60, pp. 11-17. ISSN 1878-4216; 0278-5846.

MARTIN, S.; VINCENT, J. P. and MAZELLA, J. Involvement of the Neurotensin Receptor-3 in the Neurotensin-Induced Migration of Human Microglia. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Feb 15, 2003, vol. 23, no. 4, pp. 1198-1205. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

MARTINS, D. H., et al. Monitoring Imatinib Plasma Concentrations in Chronic Myeloid Leukemia. *Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia*, 2011, vol. 33, no. 4, pp. 302-306. ISSN 1806-0870; 1516-8484.

MASSIE, M. J. Prevalence of Depression in Patients with Cancer. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 2004, vol. (32), no. 32, pp. 57-71. ISSN 1052-6773; 1052-6773.

MASTROENI, D., et al. Microglial Responses to Dopamine in a Cell Culture Model of Parkinson's Disease. *Neurobiology of Aging*, 20080305, Nov, 2009, vol. 30, no. 11, pp. 1805-1817. ISSN 1558-1497; 0197-4580.

MCCANN, M. J.; and ROGERS, R. C. Oxytocin Excites Gastric-Related Neurons in Rat Dorsal Vagal Complex. *The Journal of Physiology*, Sep, 1990, vol. 428, pp. 95-108. ISSN 0022-3751; 0022-3751.

MCDONOUGH, E., et al. Depression and Anxiety in Psoriatic Disease: Prevalence and Associated Factors. *The Journal of Rheumatology*, 20140401, May, 2014, vol. 41, no. 5, pp. 887-896. ISSN 0315-162X; 0315-162X.

MCGEHEE, D. S., et al. Nicotine Enhancement of Fast Excitatory Synaptic Transmission in CNS by Presynaptic Receptors. *Science (New York, N.Y.)*, Sep 22, 1995, vol. 269, no. 5231, pp. 1692-1696. ISSN 0036-8075; 0036-8075.

MCINTOSH, J. M., et al. Alpha9 Nicotinic Acetylcholine Receptors and the Treatment of Pain. *Biochemical Pharmacology*, 20090527, Oct 1, 2009, vol. 78, no. 7, pp. 693-702. ISSN 1873-2968; 0006-2952.

MECHAWAR, N., et al. Nicotinic Receptors Regulate the Survival of Newborn Neurons in the Adult Olfactory Bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20040621, Jun 29, 2004, vol. 101, no. 26, pp. 9822-9826. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

MELCHIOR, L., et al. Microduplication of 15q13.3 and Xq21.31 in a Family with Tourette Syndrome and Comorbidities. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics : The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 20130727, Dec, 2013, vol. 162B, no. 8, pp. 825-831. ISSN 1552-485X; 1552-4841.

MENEGON, A., et al. Protein Kinase A-Mediated Synapsin I Phosphorylation is a Central Modulator of Ca²⁺-Dependent Synaptic Activity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Nov 8, 2006, vol. 26, no. 45, pp. 11670-11681. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

METZ, C. N.; and TRACEY, K. J. It Takes Nerve to Dampen Inflammation. *Nature Immunology*, Aug, 2005, vol. 6, no. 8, pp. 756-757. ISSN 1529-2908; 1529-2908.

MEYER, J. H., et al. Elevated Monoamine Oxidase a Levels in the Brain: An Explanation for the Monoamine Imbalance of Major Depression. *Archives of General Psychiatry*, Nov, 2006, vol. 63, no. 11, pp. 1209-1216. ISSN 0003-990X; 0003-990X.

MEYERS, C. A.; ALBITAR, M. and ESTEY, E. Cognitive Impairment, Fatigue, and Cytokine Levels in Patients with Acute Myelogenous Leukemia Or Myelodysplastic Syndrome. *Cancer*, Aug 15, 2005, vol. 104, no. 4, pp. 788-793. ISSN 0008-543X; 0008-543X.

MEYERSON, L. R., et al. Human Brain Receptor Alterations in Suicide Victims. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, Jul, 1982, vol. 17, no. 1, pp. 159-163. ISSN 0091-3057; 0091-3057.

MILLAR, N. S.; and HARKNESS, P. C. Assembly and Trafficking of Nicotinic Acetylcholine Receptors (Review). *Molecular Membrane Biology*, May, 2008, vol. 25, no. 4, pp. 279-292. ISSN 0968-7688; 0968-7688.

MILLER, A. H., et al. Cytokine Targets in the Brain: Impact on Neurotransmitters and Neurocircuits. *Depression and Anxiety*, 20130306, Apr, 2013, vol. 30, no. 4, pp. 297-306. ISSN 1520-6394; 1091-4269.

MILLER, A. H.; MALETIC, V. and RAISON, C. L. Inflammation and its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biological Psychiatry*, 20090115, May 1, 2009a, vol. 65, no. 9, pp. 732-741. ISSN 1873-2402; 0006-3223.

MILLER, C. L., et al. Two Complex Genotypes Relevant to the Kynurenine Pathway and Melanotropin Function show Association with Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Schizophrenia Research*, 20090606, Sep, 2009b, vol. 113, no. 2-3, pp. 259-267. ISSN 1573-2509; 0920-9964.

MILLER, P. S.; and SMART, T. G. Binding, Activation and Modulation of Cys-Loop Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20100125, Apr, 2010, vol. 31, no. 4, pp. 161-174. ISSN 1873-3735; 0165-6147.

MINEUR, Y. S., et al. Nicotine Decreases Food Intake through Activation of POMC Neurons. *Science (New York, N.Y.)*, Jun 10, 2011, vol. 332, no. 6035, pp. 1330-1332. ISSN 1095-9203; 0036-8075.

MINEUR, Y. S.; SOMENZI, O. and PICCIOTTO, M. R. Cytisine, a Partial Agonist of High-Affinity Nicotinic Acetylcholine Receptors, has Antidepressant-Like Properties in Male C57BL/6J Mice. *Neuropharmacology*, 20070120, Apr, 2007, vol. 52, no. 5, pp. 1256-1262. ISSN 0028-3908; 0028-3908.

MISHINA, M., et al. Molecular Distinction between Fetal and Adult Forms of Muscle Acetylcholine Receptor. *Nature*, May 22-28, 1986, vol. 321, no. 6068, pp. 406-411. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

MOGENSEN, T. H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr, 2009, vol. 22, no. 2, pp. 240-73, Table of Contents. ISSN 1098-6618; 0893-8512.

MORETTI, M., et al. Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes Expression during Rat Retina Development and their Regulation by Visual Experience. *Molecular Pharmacology*, Jul, 2004, vol. 66, no. 1, pp. 85-96. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

MORETTI, M., et al. The Novel $\alpha 7\beta 2$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtype is Expressed in Mouse and Human Basal Forebrain: Biochemical and Pharmacological Characterization. *Molecular Pharmacology*, 20140707, Sep, 2014, vol. 86, no. 3, pp. 306-317. ISSN 1521-0111; 0026-895X.

MORLEY, B. J.; and MERVIS, R. F. Dendritic Spine Alterations in the Hippocampus and Parietal Cortex of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Knockout Mice. *Neuroscience*, 20121224, Mar 13, 2013, vol. 233, pp. 54-63. ISSN 1873-7544; 0306-4522.

MORONI, M., et al. Non-Agonist-Binding Subunit Interfaces Confer Distinct Functional Signatures to the Alternate Stoichiometries of the $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Receptor: An $\alpha 4\alpha 4$ Interface is Required for Zn^{2+} Potentiation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Jul 2, 2008, vol. 28, no. 27, pp. 6884-6894. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

MORONI, M., et al. $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Receptors with High and Low Acetylcholine Sensitivity: Pharmacology, Stoichiometry, and Sensitivity to Long-Term Exposure to Nicotine. *Molecular Pharmacology*, 20060523, Aug, 2006, vol. 70, no. 2, pp. 755-768. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

MOSSER, D. M.; and EDWARDS, J. P. Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation. *Nature Reviews.Immunology*, Dec, 2008, vol. 8, no. 12, pp. 958-969. ISSN 1474-1741; 1474-1733.

MOTIVALA, S. J., et al. Inflammatory Markers and Sleep Disturbance in Major Depression. *Psychosomatic Medicine*, Mar-Apr, 2005, vol. 67, no. 2, pp. 187-194. ISSN 1534-7796; 0033-3174.

MUKHERJEE, J., et al. Mutations of Cytosolic Loop Residues Impair Assembly and Maturation of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal of Neurochemistry*, 20090717, Sep, 2009, vol. 110, no. 6, pp. 1885-1894. ISSN 1471-4159; 0022-3042.

MULLE, C.; LENA, C. and CHANGEUX, J. P. Potentiation of Nicotinic Receptor Response by External Calcium in Rat Central Neurons. *Neuron*, May, 1992, vol. 8, no. 5, pp. 937-945. ISSN 0896-6273; 0896-6273.

MULLER, M. B., et al. Neither Major Depression nor Glucocorticoid Treatment Affects the Cellular Integrity of the Human Hippocampus. *The European Journal of Neuroscience*, Nov, 2001, vol. 14, no. 10, pp. 1603-1612. ISSN 0953-816X; 0953-816X.

MULLER, N., et al. The Cyclooxygenase-2 Inhibitor Celecoxib has Therapeutic Effects in Major Depression: Results of a Double-Blind, Randomized, Placebo Controlled, Add-on Pilot Study to Reboxetine. *Molecular Psychiatry*, 20060221, Jul, 2006, vol. 11, no. 7, pp. 680-684. ISSN 1359-4184; 1359-4184.

MURRAY, C. J.; and LOPEZ, A. D. Evidence-Based Health Policy--Lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science (New York, N.Y.)*, Nov 1, 1996, vol. 274, no. 5288, pp. 740-743. ISSN 0036-8075; 0036-8075.

MUSSELMAN, D. L., et al. Paroxetine for the Prevention of Depression Induced by High-Dose Interferon Alfa. *The New England Journal of Medicine*, Mar 29, 2001, vol. 344, no. 13, pp. 961-966. ISSN 0028-4793; 0028-4793.

MUTTENTHALER, M., et al. Solving the Alpha-Conotoxin Folding Problem: Efficient Selenium-Directed on-Resin Generation of More Potent and Stable Nicotinic Acetylcholine Receptor Antagonists. *Journal of the American Chemical Society*, Mar 17, 2010, vol. 132, no. 10, pp. 3514-3522. ISSN 1520-5126; 0002-7863.

MYINT, A. M., et al. Effect of the COX-2 Inhibitor Celecoxib on Behavioural and Immune Changes in an Olfactory Bulbectomised Rat Model of Depression. *Neuroimmunomodulation*, 20070821, 2007, vol. 14, no. 2, pp. 65-71. ISSN 1021-7401; 1021-7401.

NA, K. S., et al. Efficacy of Adjunctive Celecoxib Treatment for Patients with Major Depressive Disorder: A Meta-Analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 20130920, Jan 3, 2014, vol. 48, pp. 79-85. ISSN 1878-4216; 0278-5846.

NAGELE, R. G., et al. Intracellular Accumulation of Beta-Amyloid(1-42) in Neurons is Facilitated by the Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor in Alzheimer's Disease. *Neuroscience*, 2002, vol. 110, no. 2, pp. 199-211. ISSN 0306-4522; 0306-4522.

NAI, Q.; MCINTOSH, J. M. and MARGIOTTA, J. F. Relating Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes Defined by Subunit Composition and Channel Function. *Molecular Pharmacology*, Feb, 2003, vol. 63, no. 2, pp. 311-324. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

NEFF, R. A., 3rd, et al. Postsynaptic Scaffolds for Nicotinic Receptors on Neurons. *Acta Pharmacologica Sinica*, 20090511, Jun, 2009, vol. 30, no. 6, pp. 694-701. ISSN 1745-7254; 1671-4083.

NESTLER, E. J., et al. Neurobiology of Depression. *Neuron*, Mar 28, 2002, vol. 34, no. 1, pp. 13-25. ISSN 0896-6273; 0896-6273.

NGUYEN, K. T., et al. Timecourse and Corticosterone Sensitivity of the Brain, Pituitary, and Serum Interleukin-1beta Protein Response to Acute Stress. *Brain Research*, Mar 24, 2000, vol. 859, no. 2, pp. 193-201. ISSN 0006-8993; 0006-8993.

NI, M., et al. A Potential Role of Alpha-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor in Cardiac Angiogenesis in a Pressure-Overload Rat Model. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2010, vol. 114, no. 3, pp. 311-319. ISSN 1347-8648; 1347-8613.

NIBUYA, M.; MORINOBU, S. and DUMAN, R. S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in Rat Brain by Chronic Electroconvulsive Seizure and Antidepressant Drug Treatments. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Nov, 1995, vol. 15, no. 11, pp. 7539-7547. ISSN 0270-6474; 0270-6474.

NICHOLS, B. J. A Distinct Class of Endosome Mediates Clathrin-Independent Endocytosis to the Golgi Complex. *Nature Cell Biology*, May, 2002, vol. 4, no. 5, pp. 374-378. ISSN 1465-7392; 1465-7392.

NORDMAN, J. C.; and KABBANI, N. An Interaction between Alpha7 Nicotinic Receptors and a G-Protein Pathway Complex Regulates Neurite Growth in Neural Cells. *Journal of Cell Science*, 20120906, Nov 15, 2012, vol. 125, no. Pt 22, pp. 5502-5513. ISSN 1477-9137; 0021-9533.

NORRHOLM, S. D.; and OUIMET, C. C. Altered Dendritic Spine Density in Animal Models of Depression and in Response to Antidepressant Treatment. *Synapse (New York, N.Y.)*, Dec 1, 2001, vol. 42, no. 3, pp. 151-163. ISSN 0887-4476; 0887-4476.

NUNES, S. O., et al. Immune and Hormonal Activity in Adults Suffering from Depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, May, 2002, vol. 35, no. 5, pp. 581-587. ISSN 0100-879X; 0100-879X.

NURNBERGER, J. I., Jr, et al. Evidence for a Locus on Chromosome 1 that Influences Vulnerability to Alcoholism and Affective Disorder. *The American Journal of Psychiatry*, May, 2001, vol. 158, no. 5, pp. 718-724. ISSN 0002-953X; 0002-953X.

OGAWA, H., et al. Th2-Inducing Cytokines IL-4 and IL-33 Synergistically Elicit the Expression of Transmembrane TNF-Alpha on Macrophages through the Autocrine Action of IL-6. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20120303, Mar 30, 2012, vol. 420, no. 1, pp. 114-118. ISSN 1090-2104; 0006-291X.

O'KELLY, I., et al. Forward Transport. 14-3-3 Binding Overcomes Retention in Endoplasmic Reticulum by Dibasic Signals. *Cell*, Nov 15, 2002, vol. 111, no. 4, pp. 577-588. ISSN 0092-8674; 0092-8674.

OKUDA, H., et al. The Presence of Corticotropin-Releasing Factor-Like Immunoreactive Synaptic Vesicles in Axon Terminals with Nicotinic Acetylcholine Receptor-Like Immunoreactivity in the Median Eminence of the Rat. *Neuroscience Letters*, Oct 29, 1993, vol. 161, no. 2, pp. 183-186. ISSN 0304-3940; 0304-3940.

OLINCY, A., et al. Proof-of-Concept Trial of an Alpha7 Nicotinic Agonist in Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, Jun, 2006, vol. 63, no. 6, pp. 630-638. ISSN 0003-990X; 0003-990X.

PACE, T. W.; HU, F. and MILLER, A. H. Cytokine-Effects on Glucocorticoid Receptor Function: Relevance to Glucocorticoid Resistance and the Pathophysiology and Treatment of Major Depression. *Brain, Behavior, and Immunity*, 20061027, Jan, 2007, vol. 21, no. 1, pp. 9-19. ISSN 0889-1591; 0889-1591.

PALMA, E., et al. Nicotinic Acetylcholine Receptors Assembled from the Alpha7 and Beta3 Subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, Jun 25, 1999, vol. 274, no. 26, pp. 18335-18340. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

PATERSON, D.; and NORDBERG, A. Neuronal Nicotinic Receptors in the Human Brain. *Progress in Neurobiology*, May, 2000, vol. 61, no. 1, pp. 75-111. ISSN 0301-0082; 0301-0082.

PENG, X., et al. Human Alpha 7 Acetylcholine Receptor: Cloning of the Alpha 7 Subunit from the SH-SY5Y Cell Line and Determination of Pharmacological Properties of Native Receptors and Functional Alpha 7 Homomers Expressed in Xenopus Oocytes. *Molecular Pharmacology*, Mar, 1994, vol. 45, no. 3, pp. 546-554. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

PEUDENIER, S., et al. Human Microglial Cells: Characterization in Cerebral Tissue and in Primary Culture, and Study of their Susceptibility to HIV-1 Infection. *Annals of Neurology*, Feb, 1991, vol. 29, no. 2, pp. 152-161. ISSN 0364-5134; 0364-5134.

PHILIP, N. S., et al. Nicotinic Acetylcholine Receptors and Depression: A Review of the Preclinical and Clinical Literature. *Psychopharmacology*, 20100708, Sep, 2010, vol. 212, no. 1, pp. 1-12. ISSN 1432-2072; 0033-3158.

PICCIOTTO, M. R. Galanin and Addiction. *EXS*, 2010, vol. 102, pp. 195-208. ISSN 1023-294X; 1023-294X.

PICCIOTTO, M. R., et al. It is Not "either/Or": Activation and Desensitization of Nicotinic Acetylcholine Receptors both Contribute to Behaviors Related to Nicotine Addiction and Mood. *Progress in Neurobiology*, 20071227, Apr, 2008, vol. 84, no. 4, pp. 329-342. ISSN 0301-0082; 0301-0082.

PICCIOTTO, M. R., et al. Abnormal Avoidance Learning in Mice Lacking Functional High-Affinity Nicotine Receptor in the Brain. *Nature*, Mar 2, 1995, vol. 374, no. 6517, pp. 65-67. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

PIRL, W. F. Evidence Report on the Occurrence, Assessment, and Treatment of Depression in Cancer Patients. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 2004, vol. (32), no. 32, pp. 32-39. ISSN 1052-6773; 1052-6773.

PITTENGER, C.; and DUMAN, R. S. Stress, Depression, and Neuroplasticity: A Convergence of Mechanisms. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 20070912, Jan, 2008, vol. 33, no. 1, pp. 88-109. ISSN 0893-133X; 0893-133X.

POLLOK, B. A.; and HEIM, R. Using GFP in FRET-Based Applications. *Trends in Cell Biology*, Feb, 1999, vol. 9, no. 2, pp. 57-60. ISSN 0962-8924; 0962-8924.

PROSKOCIL, B. J., et al. Acetylcholine is an Autocrine Or Paracrine Hormone Synthesized and Secreted by Airway Bronchial Epithelial Cells. *Endocrinology*, 20040205, May, 2004, vol. 145, no. 5, pp. 2498-2506. ISSN 0013-7227; 0013-7227.

QUICK, M. W.; and LESTER, R. A. Desensitization of Neuronal Nicotinic Receptors. *Journal of Neurobiology*, Dec, 2002, vol. 53, no. 4, pp. 457-478. ISSN 0022-3034; 0022-3034.

QUIK, M.; and MCINTOSH, J. M. Striatal Alpha6* Nicotinic Acetylcholine Receptors: Potential Targets for Parkinson's Disease Therapy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 20051006, Feb, 2006, vol. 316, no. 2, pp. 481-489. ISSN 0022-3565; 0022-3565.

QUIK, M., et al. Subunit Composition of Nicotinic Receptors in Monkey Striatum: Effect of Treatments with 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Or L-DOPA. *Molecular Pharmacology*, 2004;1006, Jan, 2005, vol. 67, no. 1, pp. 32-41. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

RABENSTEIN, R. L.; CALDARONE, B. J. and PICCIOTTO, M. R. The Nicotinic Antagonist Mecamylamine has Antidepressant-Like Effects in Wild-Type but Not Beta2- Or Alpha7-Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Knockout Mice. *Psychopharmacology*, 2006;1003, Dec, 2006, vol. 189, no. 3, pp. 395-401. ISSN 0033-3158; 0033-3158.

RABER, J.; KOOB, G. F. and BLOOM, F. E. Interleukin-2 (IL-2) Induces Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Release from the Amygdala and Involves a Nitric Oxide-Mediated Signaling; Comparison with the Hypothalamic Response. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Feb, 1995, vol. 272, no. 2, pp. 815-824. ISSN 0022-3565; 0022-3565.

RAISON, C. L., et al. Depressive Symptoms and Viral Clearance in Patients Receiving Interferon-Alpha and Ribavirin for Hepatitis C. *Brain, Behavior, and Immunity*, Jan, 2005a, vol. 19, no. 1, pp. 23-27. ISSN 0889-1591; 0889-1591.

RAISON, C. L.; CAPURON, L. and MILLER, A. H. Cytokines Sing the Blues: Inflammation and the Pathogenesis of Depression. *Trends in Immunology*, 2005;1128, Jan, 2006, vol. 27, no. 1, pp. 24-31. ISSN 1471-4906; 1471-4906.

RAISON, C. L., et al. Neuropsychiatric Adverse Effects of Interferon-Alpha: Recognition and Management. *CNS Drugs*, 2005b, vol. 19, no. 2, pp. 105-123. ISSN 1172-7047; 1172-7047.

RAMIREZ-LATORRE, J., et al. Functional Contributions of Alpha5 Subunit to Neuronal Acetylcholine Receptor Channels. *Nature*, Mar 28, 1996, vol. 380, no. 6572, pp. 347-351. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

RAMOS-BRIEVA, J. A.; and CORDERO VILLAFILA, A. Validation of the Castilian Version of the Hamilton Rating Scale for Depression. *Actas Luso-Espanolas De Neurologia, Psiquiatria Y Ciencias Afines*, Jul-Aug, 1986, vol. 14, no. 4, pp. 324-334. ISSN 0300-5062; 0300-5062.

RAMSEY, L. B., et al. Antileukemic Efficacy of Continuous Vs Discontinuous Dexamethasone in Murine Models of Acute Lymphoblastic Leukemia. *PloS One*, 2015;0807, Aug 7, 2015, vol. 10, no. 8, pp. e0135134. ISSN 1932-6203; 1932-6203.

RAUX, G., et al. The -2 Bp Deletion in Exon 6 of the 'Alpha 7-Like' Nicotinic Receptor Subunit Gene is a Risk Factor for the P50 Sensory Gating Deficit. *Molecular Psychiatry*, 2002, vol. 7, no. 9, pp. 1006-1011. ISSN 1359-4184; 1359-4184.

REED, A. L., et al. Juvenile Rats in the Forced-Swim Test Model the Human Response to Antidepressant Treatment for Pediatric Depression. *Psychopharmacology*, 2008;108, Apr, 2008, vol. 197, no. 3, pp. 433-441. ISSN 0033-3158; 0033-3158.

REICHENBERG, A., et al. Endotoxin-Induced Changes in Food Consumption in Healthy Volunteers are Associated with TNF-Alpha and IL-6 Secretion. *Psychoneuroendocrinology*, Nov, 2002, vol. 27, no. 8, pp. 945-956. ISSN 0306-4530; 0306-4530.

REZVANI, K.; TENG, Y. and DE BIASI, M. The Ubiquitin-Proteasome System Regulates the Stability of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 2009;0820, Jan, 2010, vol. 40, no. 1-2, pp. 177-184. ISSN 1559-1166; 0895-8696.

RILEY, B., et al. A 3-Mb Map of a Large Segmental Duplication Overlapping the Alpha7-Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene (CHRNA7) at Human 15q13-q14. *Genomics*, Feb, 2002, vol. 79, no. 2, pp. 197-209. ISSN 0888-7543; 0888-7543.

RISCH, N., et al. Interaction between the Serotonin Transporter Gene (5-HTTLPR), Stressful Life Events, and Risk of Depression: A Meta-Analysis. *Jama*, Jun 17, 2009, vol. 301, no. 23, pp. 2462-2471. ISSN 1538-3598; 0098-7484.

ROCK, R. B., et al. Potentiation of HIV-1 Expression in Microglial Cells by Nicotine: Involvement of Transforming Growth Factor-Beta 1. *Journal of Neuroimmune Pharmacology : The Official Journal of the Society on Neuroimmune Pharmacology*, 2007;1204, Sep, 2008, vol. 3, no. 3, pp. 143-149. ISSN 1557-1904; 1557-1890.

ROERIG, B.; NELSON, D. A. and KATZ, L. C. Fast Synaptic Signaling by Nicotinic Acetylcholine and Serotonin 5-HT3 Receptors in Developing Visual Cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Nov 1, 1997, vol. 17, no. 21, pp. 8353-8362. ISSN 0270-6474; 0270-6474.

ROLAND, J. J., et al. Increasing Hippocampal Acetylcholine Levels Enhance Behavioral Performance in an Animal Model of Diencephalic Amnesia. *Brain Research*, 2008;0805, Oct 9, 2008, vol. 1234, pp. 116-127. ISSN 0006-8993; 0006-8993.

ROSAS-BALLINA, M., et al. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science (New York, N.Y.)*, 2011;0915, Oct 7, 2011, vol. 334, no. 6052, pp. 98-101. ISSN 1095-9203; 0036-8075.

ROSAS-BALLINA, M.; and TRACEY, K. J. The Neurology of the Immune System: Neural Reflexes Regulate Immunity. *Neuron*, Oct 15, 2009, vol. 64, no. 1, pp. 28-32. ISSN 1097-4199; 0896-6273.

ROUMESTAN, C., et al. Anti-Inflammatory Properties of Desipramine and Fluoxetine. *Respiratory Research*, 20070503, May 3, 2007, vol. 8, pp. 35. ISSN 1465-993X; 1465-9921.

RUDISCH, B.; and NEMEROFF, C. B. Epidemiology of Comorbid Coronary Artery Disease and Depression. *Biological Psychiatry*, Aug 1, 2003, vol. 54, no. 3, pp. 227-240. ISSN 0006-3223; 0006-3223.

RUSHFORTH, S. L., et al. Subtype-Selective Nicotinic Agonists Enhance Olfactory Working Memory in Normal Rats: A Novel use of the Odour Span Task. *Neuroscience Letters*, 20100118, Mar 3, 2010, vol. 471, no. 2, pp. 114-118. ISSN 1872-7972; 0304-3940.

RYAN, S.; and MCGUIRE, B. Psychological Predictors of Pain Severity, Pain Interference, Depression, and Anxiety in Rheumatoid Arthritis Patients with Chronic Pain. *British Journal of Health Psychology*, 20151103, May, 2016, vol. 21, no. 2, pp. 336-350. ISSN 2044-8287; 1359-107X.

SACCONI, N. L., et al. The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 Nicotinic Receptor Subunit Gene Cluster Affects Risk for Nicotine Dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Research*, 20090825, Sep 1, 2009, vol. 69, no. 17, pp. 6848-6856. ISSN 1538-7445; 0008-5472.

SAEED, R. W., et al. Cholinergic Stimulation Blocks Endothelial Cell Activation and Leukocyte Recruitment during Inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, Apr 4, 2005, vol. 201, no. 7, pp. 1113-1123. ISSN 0022-1007; 0022-1007.

SANTARELLI, L., et al. Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. *Science (New York, N.Y.)*, Aug 8, 2003, vol. 301, no. 5634, pp. 805-809. ISSN 1095-9203; 0036-8075.

SAVITZ, J., et al. Putative Neuroprotective and Neurotoxic Kynurenine Pathway Metabolites are Associated with Hippocampal and Amygdalar Volumes in Subjects with Major Depressive Disorder. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 20140730, Jan, 2015, vol. 40, no. 2, pp. 463-471. ISSN 1740-634X; 0893-133X.

SAWAKI, A., et al. Imatinib Plasma Levels during Successful Long-Term Treatment of Metastatic-Gastrointestinal Stromal Tumors. *Hepato-Gastroenterology*, Oct, 2014, vol. 61, no. 135, pp. 1984-1989. ISSN 0172-6390; 0172-6390.

SCHAAF, C. P. Nicotinic Acetylcholine Receptors in Human Genetic Disease. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 20140220, Sep, 2014, vol. 16, no. 9, pp. 649-656. ISSN 1530-0366; 1098-3600.

SCHILDKRAUT, J. J. The Catecholamine Hypothesis of Affective Disorders: A Review of Supporting Evidence. 1965. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, Fall, 1995, vol. 7, no. 4, pp. 524-33; discussion 523-4. ISSN 0895-0172; 0895-0172.

SCHWARCZ, R.; and PELLICCIARI, R. Manipulation of Brain Kynurenines: Glial Targets, Neuronal Effects, and Clinical Opportunities. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Oct, 2002, vol. 303, no. 1, pp. 1-10. ISSN 0022-3565; 0022-3565.

SEGUELA, P., et al. Molecular Cloning, Functional Properties, and Distribution of Rat Brain Alpha 7: A Nicotinic Cation Channel Highly Permeable to Calcium. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Feb, 1993, vol. 13, no. 2, pp. 596-604. ISSN 0270-6474; 0270-6474.

SERANTES, R., et al. Interleukin-1beta Enhances GABAA Receptor Cell-Surface Expression by a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway: Relevance to Sepsis-Associated Encephalopathy. *The Journal of Biological Chemistry*, 20060327, May 26, 2006, vol. 281, no. 21, pp. 14632-14643. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

SEVERANCE, E. G., et al. The Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Exists in Two Isoforms that Contribute to Functional Ligand-Gated Ion Channels. *Molecular Pharmacology*, Sep, 2004, vol. 66, no. 3, pp. 420-429. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

SHARMA, G.; and VIJAYARAGHAVAN, S. Nicotinic Receptor Signaling in Nonexcitable Cells. *Journal of Neurobiology*, Dec, 2002, vol. 53, no. 4, pp. 524-534. ISSN 0022-3034; 0022-3034.

SHARMA, G.; and VIJAYARAGHAVAN, S. Nicotinic Cholinergic Signaling in Hippocampal Astrocytes Involves Calcium-Induced Calcium Release from Intracellular Stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20010320, Mar 27, 2001, vol. 98, no. 7, pp. 4148-4153. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

SHARP, A. J., et al. A Recurrent 15q13.3 Microdeletion Syndrome Associated with Mental Retardation and Seizures. *Nature Genetics*, 20080217, Mar, 2008, vol. 40, no. 3, pp. 322-328. ISSN 1546-1718; 1061-4036.

SHAW, S.; BENCHERIF, M. and MARRERO, M. B. Angiotensin II Blocks Nicotine-Mediated Neuroprotection Against Beta-Amyloid (1-42) Via Activation of the Tyrosine Phosphatase SHP-1. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Dec 3, 2003, vol. 23, no. 35, pp. 11224-11228. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

SHAW, S.; BENCHERIF, M. and MARRERO, M. B. Janus Kinase 2, an Early Target of Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor-Mediated Neuroprotection Against Abeta-(1-42) Amyloid. *The Journal of Biological Chemistry*, 20020918, Nov 22, 2002, vol. 277, no. 47, pp. 44920-44924. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

sheila botts y melody ryan. *Drug-Induced Disease: Prevention, Detection and Management*.

SHEN, J. X.; and YAKEL, J. L. Nicotinic Acetylcholine Receptor-Mediated Calcium Signaling in the Nervous System. *Acta Pharmacologica Sinica*, 20090518, Jun, 2009, vol. 30, no. 6, pp. 673-680. ISSN 1745-7254; 1671-4083.

SHIMOHAMA, S. Nicotinic Receptor-Mediated Neuroprotection in Neurodegenerative Disease Models. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Mar, 2009, vol. 32, no. 3, pp. 332-336. ISSN 0918-6158; 0918-6158.

SHIRAYAMA, Y., et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Produces Antidepressant Effects in Behavioral Models of Depression. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Apr 15, 2002, vol. 22, no. 8, pp. 3251-3261. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

SHYTLER, R. D., et al. Cholinergic Modulation of Microglial Activation by Alpha 7 Nicotinic Receptors. *Journal of Neurochemistry*, Apr, 2004, vol. 89, no. 2, pp. 337-343. ISSN 0022-3042; 0022-3042.

SHYTLER, R. D., et al. Nicotinic Acetylcholine Receptors as Targets for Antidepressants. *Molecular Psychiatry*, 2002a, vol. 7, no. 6, pp. 525-535. ISSN 1359-4184; 1359-4184.

SHYTLER, R. D., et al. Neuronal Nicotinic Receptor Inhibition for Treating Mood Disorders: Preliminary Controlled Evidence with Mecamylamine. *Depression and Anxiety*, 2002b, vol. 16, no. 3, pp. 89-92. ISSN 1091-4269; 1091-4269.

SIMPSON A.W.M. *Fluorescent Measurement of $[Ca^{2+}]_i$: Basic Practical Considerations Calcium Signaling Protocols*. 30th ed. Totowa, NJ, U.S.A.: , 1999.

SINKUS, M. L., et al. A 2-Base Pair Deletion Polymorphism in the Partial Duplication of the Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Gene (CHRFAM7A) on Chromosome 15q14 is Associated with Schizophrenia. *Brain Research*, 20090723, Sep 29, 2009, vol. 1291, pp. 1-11. ISSN 1872-6240; 0006-8993.

SLATTERY, D. A.; and NEUMANN, I. D. Chronic Icv Oxytocin Attenuates the Pathological High Anxiety State of Selectively Bred Wistar Rats. *Neuropharmacology*, 20090707, Jan, 2010, vol. 58, no. 1, pp. 56-61. ISSN 1873-7064; 0028-3908.

SMIT, A. B., et al. Structure and Function of AChBP, Homologue of the Ligand-Binding Domain of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Sep, 2003, vol. 998, pp. 81-92. ISSN 0077-8923; 0077-8923.

SMIT, A. B., et al. A Glia-Derived Acetylcholine-Binding Protein that Modulates Synaptic Transmission. *Nature*, May 17, 2001, vol. 411, no. 6835, pp. 261-268. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

SOBEL, A.; WEBER, M. and CHANGEUX, J. P. Large-Scale Purification of the Acetylcholine-Receptor Protein in its Membrane-Bound and Detergent-Extracted Forms from Torpedo Marmorata Electric Organ. *European Journal of Biochemistry*, Oct 17, 1977, vol. 80, no. 1, pp. 215-224. ISSN 0014-2956; 0014-2956.

SOLIS-GARRIDO, L. M., et al. Cross-Talk between Native Plasmalemmal Na^+/Ca^{2+} Exchanger and Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Sensitive Ca^{2+} Internal Store in Xenopus Oocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 20040916, Dec 10, 2004, vol. 279, no. 50, pp. 52414-52424. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

SONG, F., et al. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: Meta-Analysis of Efficacy and Acceptability. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, Mar 13, 1993, vol. 306, no. 6879, pp. 683-687. ISSN 0959-8138; 0959-535X.

SONG, J. J., et al. Crystal Structure of Argonaute and its Implications for RISC Slicer Activity. *Science (New York, N.Y.)*, 20040729, Sep 3, 2004, vol. 305, no. 5689, pp. 1434-1437. ISSN 1095-9203; 0036-8075.

SOUTHERN, P. J.; and BERG, P. Transformation of Mammalian Cells to Antibiotic Resistance with a Bacterial Gene Under Control of the SV40 Early Region Promoter. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 1982, vol. 1, no. 4, pp. 327-341. ISSN 0271-6801; 0271-6801.

ST JOHN, P. A. Cellular Trafficking of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Acta Pharmacologica Sinica*, Jun, 2009, vol. 30, no. 6, pp. 656-662. ISSN 1745-7254; 1671-4083.

Stahl S. . *Psicofarmacología Esencial: Bases Neurocientíficas Y Aplicaciones Clínicas*. . ArieS.A. ed., tercera ed. , 2000.

STEINER, J., et al. Severe Depression is Associated with Increased Microglial Quinolinic Acid in Subregions of the Anterior Cingulate Gyrus: Evidence for an Immune-Modulated Glutamatergic Neurotransmission?. *Journal of Neuroinflammation*, 20110810, Aug 10, 2011, vol. 8, pp. 94-2094-8-94. ISSN 1742-2094; 1742-2094.

STEINGARD, R. J., et al. Increased Orbitofrontal Cortex Levels of Choline in Depressed Adolescents as Detected by in Vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biological Psychiatry*, Dec 1, 2000, vol. 48, no. 11, pp. 1053-1061. ISSN 0006-3223; 0006-3223.

STEINLEIN, O. K.; and BERTRAND, D. Nicotinic Receptor Channelopathies and Epilepsy. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 20091217, Jul, 2010, vol. 460, no. 2, pp. 495-503. ISSN 1432-2013; 0031-6768.

STEPHENS, S. H., et al. Association of the 5'-Upstream Regulatory Region of the Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Gene (CHRNA7) with Schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 20090131, Apr, 2009, vol. 109, no. 1-3, pp. 102-112. ISSN 0920-9964; 0920-9964.

SUBLETTE, M. E., et al. Plasma Kynurenine Levels are Elevated in Suicide Attempters with Major Depressive Disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 20110514, Aug, 2011, vol. 25, no. 6, pp. 1272-1278. ISSN 1090-2139; 0889-1591.

SUDHOF, T. C. The Synaptic Vesicle Cycle: A Cascade of Protein-Protein Interactions. *Nature*, Jun 22, 1995, vol. 375, no. 6533, pp. 645-653. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

SUGAYA, K.; GIACOBINI, E.and CHIAPPINELLI, V. A. Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes in Human Frontal Cortex: Changes in Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience Research*, Nov, 1990, vol. 27, no. 3, pp. 349-359. ISSN 0360-4012; 0360-4012.

SULLIVAN, P. F., et al. Genome-Wide Association for Major Depressive Disorder: A Possible Role for the Presynaptic Protein Piccolo. *Molecular Psychiatry*, 20081209, Apr, 2009, vol. 14, no. 4, pp. 359-375. ISSN 1476-5578; 1359-4184.

SUN, F.; JIN, K.and UTESHEV, V. V. A Type-II Positive Allosteric Modulator of Alpha7 nAChRs Reduces Brain Injury and Improves Neurological Function After Focal Cerebral Ischemia in Rats. *PLoS One*, 20130809, Aug 9, 2013, vol. 8, no. 8, pp. e73581. ISSN 1932-6203; 1932-6203.

Sunanda; RAO, B. S.and RAJU, T. R. Restraint Stress-Induced Alterations in the Levels of Biogenic Amines, Amino Acids, and AChE Activity in the Hippocampus. *Neurochemical Research*, Dec, 2000, vol. 25, no. 12, pp. 1547-1552. ISSN 0364-3190; 0364-3190.

SUWANJANG, W., et al. Melatonin Prevents Cytosolic Calcium Overload, Mitochondrial Damage and Cell Death due to Toxically High Doses of Dexamethasone-Induced Oxidative Stress in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Neurochemistry International*, 20160504, Jul, 2016, vol. 97, pp. 34-41. ISSN 1872-9754; 0197-0186.

SWEATT, J. D. The Neuronal MAP Kinase Cascade: A Biochemical Signal Integration System Subserving Synaptic Plasticity and Memory. *Journal of Neurochemistry*, Jan, 2001, vol. 76, no. 1, pp. 1-10. ISSN 0022-3042; 0022-3042.

SZCZEPANIK, A. M.; and RINGHEIM, G. E. IL-10 and Glucocorticoids Inhibit Abeta(1-42)- and Lipopolysaccharide-Induced Pro-Inflammatory Cytokine and Chemokine Induction in the Central Nervous System. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, Apr, 2003, vol. 5, no. 2, pp. 105-117. ISSN 1387-2877; 1387-2877.

TALY, A., et al. Nicotinic Receptors: Allosteric Transitions and Therapeutic Targets in the Nervous System. *Nature Reviews.Drug Discovery*, Sep, 2009, vol. 8, no. 9, pp. 733-750. ISSN 1474-1784; 1474-1776.

TAPIA, L.; KURYATOV, A.and LINDSTROM, J. Ca²⁺ Permeability of the (Alpha4)3(Beta2)2 Stoichiometry Greatly Exceeds that of (Alpha4)2(Beta2)3 Human Acetylcholine Receptors. *Molecular Pharmacology*, 20061128, Mar, 2007, vol. 71, no. 3, pp. 769-776. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

TAPPER, A. R., et al. Nicotine Activation of Alpha4* Receptors: Sufficient for Reward, Tolerance, and Sensitization. *Science (New York, N.Y.)*, Nov 5, 2004, vol. 306, no. 5698, pp. 1029-1032. ISSN 1095-9203; 0036-8075.

THANY, S. H., et al. Exploring the Pharmacological Properties of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20061206, Jan, 2007, vol. 28, no. 1, pp. 14-22. ISSN 0165-6147; 0165-6147.

THIERRY-MIEG, D.; and THIERRY-MIEG, J. AceView: A Comprehensive cDNA-Supported Gene and Transcripts Annotation. *Genome Biology*, 20060807, 2006, vol. 7 Suppl 1, pp. S12.1-14. ISSN 1474-760X; 1474-7596.

THOMPSON RAY, M., et al. Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA Expression in the Hippocampus of Individuals with Schizophrenia and Mood Disorders. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, May, 2011, vol. 36, no. 3, pp. 195-203. ISSN 1488-2434; 1180-4882.

THOMSEN, M. S.; and MIKKELSEN, J. D. The Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Ligands Methyllaconitine, NS6740 and GTS-21 Reduce Lipopolysaccharide-Induced TNF-Alpha Release from Microglia. *Journal of Neuroimmunology*, 20120809, Oct 15, 2012, vol. 251, no. 1-2, pp. 65-72. ISSN 1872-8421; 0165-5728.

TIMMERMAN, D. B., et al. An Allosteric Modulator of the Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Possessing Cognition-Enhancing Properties in Vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 20070711, Oct, 2007, vol. 323, no. 1, pp. 294-307. ISSN 0022-3565; 0022-3565.

TOLL, L., et al. AT-1001: A High Affinity and Selective alpha3beta4 Nicotinic Acetylcholine Receptor Antagonist Blocks Nicotine Self-Administration in Rats. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 20120125, May, 2012, vol. 37, no. 6, pp. 1367-1376. ISSN 1740-634X; 0893-133X.

Tommaso Tofani Matteo Zanardelli lorenzo Di Cesare Mannelli Stefano Pallanti. An Immunologic Profile Study in Drug-Naive Generalized Anxiety Non Depressed Patients: A Pilot Study. 2010.

TOMOVA, R., et al. Changes in Cytokine Profile during Local IL-2 Therapy in Cancer Patients. *Anticancer Research*, May-Jun, 2006, vol. 26, no. 3A, pp. 2037-2047. ISSN 0250-7005; 0250-7005.

TRACEY, K. J. Reflex Control of Immunity. *Nature Reviews.Immunology*, Jun, 2009, vol. 9, no. 6, pp. 418-428. ISSN 1474-1741; 1474-1733.

TREDWAY, T. L.; GUO, J. Z. and CHIAPPINELLI, V. A. N-Type Voltage-Dependent Calcium Channels Mediate the Nicotinic Enhancement of GABA Release in Chick Brain. *Journal of Neurophysiology*, Feb, 1999, vol. 81, no. 2, pp. 447-454. ISSN 0022-3077; 0022-3077.

TRININ, M. RIC-3 and Nicotinic Acetylcholine Receptors: Biogenesis, Properties, and Diversity. *Biotechnology Journal*, Dec, 2008, vol. 3, no. 12, pp. 1539-1547. ISSN 1860-7314; 1860-6768.

TRUDLER, D.; FARFARA, D. and FRENKEL, D. Toll-Like Receptors Expression and Signaling in Glia Cells in Neuro-Amyloidogenic Diseases: Towards Future Therapeutic Application. *Mediators of Inflammation*, 20100725, 2010, vol. 2010, pp. 10.1155/2010/497987. Epub 2010 Jul 25. ISSN 1466-1861; 0962-9351.

TSIANAKAS, A., et al. Induction of an Anti-Inflammatory Human Monocyte Subtype is a Unique Property of Glucocorticoids, but can be Modified by IL-6 and IL-10. *Immunobiology*, 20111020, Mar, 2012, vol. 217, no. 3, pp. 329-335. ISSN 1878-3279; 0171-2985.

TUMA, J., et al. Anxiolytic-Like Action of the Antidepressant Agomelatine (S 20098) After a Social Defeat Requires the Integrity of the SCN. *European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 20050421, Oct, 2005, vol. 15, no. 5, pp. 545-555. ISSN 0924-977X; 0924-977X.

TURAN, C.; KESEBIR, S. and SUNER, O. Are ICAM, VCAM and E-Selectin Levels Different in First Manic Episode and Subsequent Remission?. *Journal of Affective Disorders*, 20140412, Jul, 2014, vol. 163, pp. 76-80. ISSN 1573-2517; 0165-0327.

TUREK, F. W. From Circadian Rhythms to Clock Genes in Depression. *International Clinical Psychopharmacology*, Oct, 2007, vol. 22 Suppl 2, pp. S1-8. ISSN 0268-1315; 0268-1315.

TURNER, T. J. Nicotine Enhancement of Dopamine Release by a Calcium-Dependent Increase in the Size of the Readily Releasable Pool of Synaptic Vesicles. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Dec 15, 2004, vol. 24, no. 50, pp. 11328-11336. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

TYRING, S., et al. Etanercept and Clinical Outcomes, Fatigue, and Depression in Psoriasis: Double-Blind Placebo-Controlled Randomised Phase III Trial. *Lancet (London, England)*, Jan 7, 2006, vol. 367, no. 9504, pp. 29-35. ISSN 1474-547X; 0140-6736.

UNWIN, N. Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4A Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 20050125, Mar 4, 2005, vol. 346, no. 4, pp. 967-989. ISSN 0022-2836; 0022-2836.

UNWIN, N. Nicotinic Acetylcholine Receptor at 9 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, Feb 20, 1993, vol. 229, no. 4, pp. 1101-1124. ISSN 0022-2836; 0022-2836.

UTESHEV, V. V. The Therapeutic Promise of Positive Allosteric Modulation of Nicotinic Receptors. *European Journal of Pharmacology*, 20140212, Mar 15, 2014, vol. 727, pp. 181-185. ISSN 1879-0712; 0014-2999.

VALLES, A. S.; and BARRANTES, F. J. Chaperoning Alpha7 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 20111022, Mar, 2012, vol. 1818, no. 3, pp. 718-729. ISSN 0006-3002; 0006-3002.

VALOR, L. M., et al. Transcriptional Regulation by Activation and Repression Elements Located at the 5'-Noncoding Region of the Human Alpha9 Nicotinic Receptor Subunit Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 20030714, Sep 26, 2003, vol. 278, no. 39, pp. 37249-37255. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

VAN DER BORGHT, K., et al. Input from the Medial Septum Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis. *Brain Research Bulletin*, Sep 30, 2005, vol. 67, no. 1-2, pp. 117-125. ISSN 0361-9230; 0361-9230.

VAN MAANEN, M. A.; VERVOORDELDONK, M. J. and TAK, P. P. The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway: Towards Innovative Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Nature Reviews. Rheumatology*, Apr, 2009, vol. 5, no. 4, pp. 229-232. ISSN 1759-4804; 1759-4790.

VAN NIEROP, P., et al. Identification of Molluscan Nicotinic Acetylcholine Receptor (nAChR) Subunits Involved in Formation of Cation- and Anion-Selective nAChRs. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Nov 16, 2005, vol. 25, no. 46, pp. 10617-10626. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

VAN WESTERLOO, D. J., et al. The Vagus Nerve and Nicotinic Receptors Modulate Experimental Pancreatitis Severity in Mice. *Gastroenterology*, May, 2006, vol. 130, no. 6, pp. 1822-1830. ISSN 0016-5085; 0016-5085.

VANDESOMPELE, J., et al. Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. *Genome Biology*, 20020618, Jun 18, 2002, vol. 3, no. 7, pp. RESEARCH0034. ISSN 1474-760X; 1474-7596.

VERBITSKY, M., et al. Mixed Nicotinic-Muscarinic Properties of the Alpha9 Nicotinic Cholinergic Receptor. *Neuropharmacology*, Oct, 2000, vol. 39, no. 13, pp. 2515-2524. ISSN 0028-3908; 0028-3908.

VICENS, P., et al. Effects of an Alpha7 Nicotinic Receptor Agonist and Stress on Spatial Memory in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 20130824, 2013, vol. 2013, pp. 952719. ISSN 2314-6141.

WADEL, K.; NEHER, E. and SAKABA, T. The Coupling between Synaptic Vesicles and Ca²⁺ Channels Determines Fast Neurotransmitter Release. *Neuron*, Feb 15, 2007, vol. 53, no. 4, pp. 563-575. ISSN 1097-4199; 0896-6273.

WANAMAKER, C. P.; CHRISTIANSON, J. C. and GREEN, W. N. Regulation of Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Sep, 2003, vol. 998, pp. 66-80. ISSN 0077-8923; 0077-8923.

WANG, H., et al. Cholinergic Agonists Inhibit HMGB1 Release and Improve Survival in Experimental Sepsis. *Nature Medicine*, 20041024, Nov, 2004, vol. 10, no. 11, pp. 1216-1221. ISSN 1078-8956; 1078-8956.

WANG, W. J.; WANG, P. X. and LI, X. J. The Effect of Sinomenine on Cyclooxygenase Activity and the Expression of COX-1 and COX-2 mRNA in Human Peripheral Monocytes. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica*, Apr, 2003, vol. 28, no. 4, pp. 352-355. ISSN 1001-5302; 1001-5302.

WANG, Y., et al. The Duplicated Alpha7 Subunits Assemble and Form Functional Nicotinic Receptors with the Full-Length Alpha7. *The Journal of Biological Chemistry*, 20140723, Sep 19, 2014, vol. 289, no. 38, pp. 26451-26463. ISSN 1083-351X; 0021-9258.

WATKINS, L. R.; and MAIER, S. F. Implications of Immune-to-Brain Communication for Sickness and Pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jul 6, 1999, vol. 96, no. 14, pp. 7710-7713. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

WEISSTAUB, N., et al. The alpha9alpha10 Nicotinic Acetylcholine Receptor is Permeable to and is Modulated by Divalent Cations. *Hearing Research*, May, 2002, vol. 167, no. 1-2, pp. 122-135. ISSN 0378-5955; 0378-5955.

WELSBY, P. J.; ROWAN, M. J. and ANWYL, R. Intracellular Mechanisms Underlying the Nicotinic Enhancement of LTP in the Rat Dentate Gyrus. *The European Journal of Neuroscience*, 20081211, Jan, 2009, vol. 29, no. 1, pp. 65-75. ISSN 1460-9568; 0953-816X.

WEN, L., et al. Contribution of Variants in CHRNA5/A3/B4 Gene Cluster on Chromosome 15 to Tobacco Smoking: From Genetic Association to Mechanism. *Molecular Neurobiology*, 20141205, Jan, 2016, vol. 53, no. 1, pp. 472-484. ISSN 1559-1182; 0893-7648.

WILLIAMS, D. K.; WANG, J. and PAPKE, R. L. Investigation of the Molecular Mechanism of the Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Positive Allosteric Modulator PNU-120596 Provides Evidence for Two Distinct Desensitized States. *Molecular Pharmacology*, 20110901, Dec, 2011, vol. 80, no. 6, pp. 1013-1032. ISSN 1521-0111; 0026-895X.

WILLIAMS, M. E., et al. Ric-3 Promotes Functional Expression of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Alpha7 Subunit in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 20041025, Jan 14, 2005, vol. 280, no. 2, pp. 1257-1263. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

WISE, M. G.; and TAYLOR, S. E. Anxiety and Mood Disorders in Medically Ill Patients. *The Journal of Clinical Psychiatry*, Jan, 1990, vol. 51 Suppl, pp. 27-32. ISSN 0160-6689; 0160-6689.

WITTMER, C. T., et al. Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. 1997. *BioTechniques*, Jun, 2013, vol. 54, no. 6, pp. 314-320. ISSN 1940-9818; 0736-6205.

WOHLEB, E. S., et al. Beta-Adrenergic Receptor Antagonism Prevents Anxiety-Like Behavior and Microglial Reactivity Induced by Repeated Social Defeat. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Apr 27, 2011, vol. 31, no. 17, pp. 6277-6288. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

WU, H. Q.; RASSOULPOUR, A. and SCHWARCZ, R. Kynurenic Acid Leads, Dopamine Follows: A New Case of Volume Transmission in the Brain?. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 20060824, Jan, 2007, vol. 114, no. 1, pp. 33-41. ISSN 0300-9564; 0300-9564.

WU, J.; and LUKAS, R. J. Naturally-Expressed Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes. *Biochemical Pharmacology*, 20110720, Oct 15, 2011, vol. 82, no. 8, pp. 800-807. ISSN 1873-2968; 0006-2952.

XIE, H. R.; HU, L. S. and LI, G. Y. SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line: In Vitro Cell Model of Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease. *Chinese Medical Journal*, Apr 20, 2010, vol. 123, no. 8, pp. 1086-1092. ISSN 0366-6999; 0366-6999.

YAKEL, J. L. Nicotinic ACh Receptors in the Hippocampus: Role in Excitability and Plasticity. *Nicotine & Tobacco Research : Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, 20120403, Nov, 2012, vol. 14, no. 11, pp. 1249-1257. ISSN 1469-994X; 1462-2203.

YAMADA, T.; and YAMANAKA, I. Microglial Localization of Alpha-Interferon Receptor in Human Brain Tissues. *Neuroscience Letters*, Apr 14, 1995, vol. 189, no. 2, pp. 73-76. ISSN 0304-3940; 0304-3940.

YANG, C., et al. Role of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Alpha3 Subtype in Vascular Inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 20160929, Nov, 2016, vol. 173, no. 22, pp. 3235-3247. ISSN 1476-5381; 0007-1188.

Yongliang Chu. *Transfection Reagents*. Patent Number 7,479,573 B2 ed. , 2009.

YOSHIMURA, R., et al. Higher Plasma Interleukin-6 (IL-6) Level is Associated with SSRI- Or SNRI-Refractory Depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 20090328, Jun 15, 2009, vol. 33, no. 4, pp. 722-726. ISSN 1878-4216; 0278-5846.

YOUNG, J. W., et al. Impaired Attention is Central to the Cognitive Deficits Observed in Alpha 7 Deficient Mice. *European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 20060502, Jan 15, 2007, vol. 17, no. 2, pp. 145-155. ISSN 0924-977X; 0924-977X.

ZDANOWSKI, R., et al. Role of Alpha7 Nicotinic Receptor in the Immune System and Intracellular Signaling Pathways. *Central-European Journal of Immunology*, 20151015, 2015, vol. 40, no. 3, pp. 373-379. ISSN 1426-3912; 1426-3912.

ZHAO, C. J., et al. Neuronal Ca²⁺ Sensor VILIP-1 Leads to the Upregulation of Functional alpha4beta2 Nicotinic Acetylcholine Receptors in Hippocampal Neurons. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 20081119, Feb, 2009, vol. 40, no. 2, pp. 280-292. ISSN 1095-9327; 1044-7431.

ZHONG, C., et al. Presynaptic Type III Neuregulin 1 is Required for Sustained Enhancement of Hippocampal Transmission by Nicotine and for Axonal Targeting of Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Sep 10, 2008, vol. 28, no. 37, pp. 9111-9116. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

ZHONG, C.; TALMAGE, D. A. and ROLE, L. W. Nicotine Elicits Prolonged Calcium Signaling Along Ventral Hippocampal Axons. *PLoS One*, 20131205, Dec 5, 2013, vol. 8, no. 12, pp. e82719. ISSN 1932-6203; 1932-6203.

ZISOOK, S., et al. Effect of Age at Onset on the Course of Major Depressive Disorder. *The American Journal of Psychiatry*, Oct, 2007, vol. 164, no. 10, pp. 1539-1546. ISSN 0002-953X; 0002-953X.

ZOLI, M.; PISTILLO, F. and GOTTI, C. Diversity of Native Nicotinic Receptor Subtypes in Mammalian Brain. *Neuropharmacology*, 20141125, Sep, 2015, vol. 96, no. Pt B, pp. 302-311. ISSN 1873-7064; 0028-3908.

ZORRILLA, E. P., et al. The Relationship of Depression and Stressors to Immunological Assays: A Meta-Analytic Review. *Brain, Behavior, and Immunity*, Sep, 2001, vol. 15, no. 3, pp. 199-226. ISSN 0889-1591; 0889-1591.

ZOU, Q.; LEUNG, S. W. and VANHOUTTE, P. M. Activation of Nicotinic Receptors can Contribute to Endothelium-Dependent Relaxations to Acetylcholine in the Rat Aorta. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 20120316, Jun, 2012, vol. 341, no. 3, pp. 756-763. ISSN 1521-0103; 0022-3565.

ZUO, Z., et al. Molecular Docking and 3D-QSAR Studies on the Binding Mechanism of Statine-Based Peptidomimetics with Beta-Secretase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Mar 15, 2005, vol. 13, no. 6, pp. 2121-2131. ISSN 0968-0896; 0968-0896.